



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup>:  
C12N 15/82, 15/52, 15/53, 9/00, 9/02,  
5/10, G01N 33/50, A01H 5/00  
A2  
(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/23231  
(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1999 (14.05.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06851

(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)

(30) Prioritätsdaten:  
197 47 739.9 29. Oktober 1997 (29.10.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT  
FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-  
FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gaters-  
leben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GRIMM, Bernhard [DE/DE];  
Corrensstrasse 2, D-06466 Gatersleben (DE). TANAKA,  
Ryouichi [JP/JP]; The Institute of Low Temperature Science,  
Hokkaido University, N19 W8, Sapporo 060-0819 (JP).

(74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald GmbH, Elisenhof,  
Elisenstrasse 3, D-80335 München (DE).

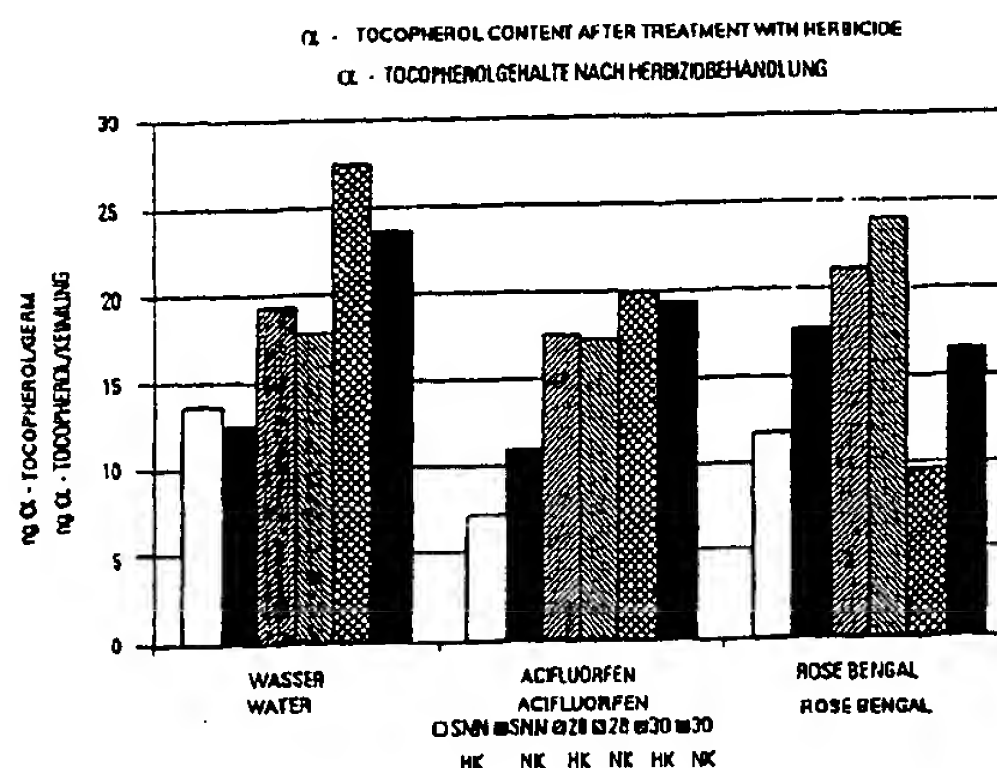
(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,  
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,  
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: MODIFICATION OF THE TOCOPHEROL CONTENT OF TRANSGENIC PLANTS

(54) Bezeichnung: BEEINFLUSSUNG DES TOCOPHEROLGEHALTES IN TRANSGENEN PFLANZEN



(57) Abstract

The invention relates to novel nucleic acid sequences which provide the coding for a geranyl geranyl reductase, to a method for producing novel plants which contain a novel nucleic acid sequence and whose tocopherol and/or chlorophyll content is modified in relation to wild type plants, to these plants and to parts, products and plant cells thereof and to the use of the nucleic acid sequences for influencing the tocopherol, chlorophyll and/or vitamin K<sub>1</sub> content of transgenic plants and parts, products and plant cells thereof.

**(57) Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für eine Geranylgeranyl-Reduktase kodieren, eine Methode zur Erzeugung neuer Pflanzen, die eine neue Nukleinsäuresequenz enthalten und deren Gehalt an Tocopherol und/oder Chlorophyll im Vergleich zu Wildtyppflanzen verändert ist, diese neuen Pflanzen, deren Teile und Produkte und Pflanzenzellen sowie die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen zur Beeinflussung des Tocopherol-, Chlorophyll- und/oder Vitamin K<sub>1</sub>-Gehaltes in transgenen Pflanzen, deren Teilen und Produkten und Pflanzenzellen.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Beeinflussung des Tocopherolgehaltes in transgenen Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für eine  
5 Geranylgeranyl-Reduktase kodieren, eine Methode zur Erzeugung neuer Pflanzen,  
die eine neue Nukleinsäuresequenz enthalten und deren Gehalt an Tocopherol  
und/oder Chlorophyll im Vergleich zu Wildtyppflanzen verändert ist, diese neuen  
Pflanzen, deren Teile und Produkte und Pflanzenzellen sowie die Verwendung der  
Nukleinsäuresequenzen zur Beeinflussung des Tocopherol-, Chlorophyll- und/oder  
10 Vitamin K<sub>1</sub>-Gehaltes in transgenen Pflanzen, deren Teilen und Produkten und  
Pflanzenzellen.

Das Diterpen Geranylgeranyl-pyrophosphat (GGPP) entsteht als 20-C-Zwischen-  
produkt im pflanzlichen Isoprenoidstoffwechsel. Es resultiert aus der Addition  
15 einer Einheit Isopentenyl-pyrophosphat (IPP) an Farnesyl-pyrophosphat, ein 15-C-  
Sesquiterpen. GGPP fließt in diverse Synthesewege des pflanzlichen Sekundär-  
stoffwechsels. So können beispielsweise zwei Moleküle GGPP "Schwanz an  
Schwanz" zu 40-C-Körpern zusammengefügt werden, die Tetraterpene, die  
allgemein als Carotinoide bezeichnet werden und zu denen beispielsweise das  $\beta$ -  
20 Carotin gehört. Durch die Addition weiterer Moleküle IPP fließt GGPP des  
weiteren in die Biosynthese von Polyterpenen, wie Kautschuk und Guttapercha,  
ein.

GGPP kann darüber hinaus in weitere Diterpene, wie z.B. Phytol-pyrophosphat  
25 (PPP), überführt werden. Der 20-C-Körper Phytol ist ein obligatorisches  
Intermediat in der Biosynthese der Tocopherole (Soll and Schulz (1981) Biochem.  
Biophys. Res. Commun. 99, 907-912) sowie der Synthese der Chlorophylle (Beale  
and Weinstein (1990) In: Biosynthesis of Heme and Chlorophyll (Dailey H.A.,  
ed.) McGraw Hill, NY, 287-391). Während die Grundstruktur aller Chlorophylle

(Chlorophyll a, b, c, usw.) ein aus 4 Pyrrolringen aufgebautes Porphyrinsystem ist, an welches das Phytol esterartig über den Pyrrolring IV gebunden ist, zeichnen sich die Tocopherole durch eine aus Homogentisat und einem Phytol-Schwanz bestehende Struktur aus.

5

Die Gruppe der Tocopherole, die allgemein als Vitamin E bezeichnet werden, umfaßt eine Reihe strukturell nahe verwandter fettlöslicher Vitamine, nämlich  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Tocopherol, wovon  $\alpha$ -Tocopherol biologisch am wichtigsten ist.

10

Die Tocopherole kommen in vielen Pflanzenölen vor, besonders reich an Tocopherolen sind die Samenöle von Soja, Weizen, Mais, Reis, Baumwolle, Luzerne und Nüssen. Auch Früchte und Gemüse, z.B. Himbeeren, Bohnen, Erbsen, Fenchel, Paprika, etc. enthalten Tocopherole. Soweit bisher bekannt werden Tocopherole ausschließlich in Pflanzen bzw. photosynthetisch aktiven Organismen synthetisiert.

15

Tocopherole tragen aufgrund ihres Redoxpotentials dazu bei, die Oxidation ungesättigter Fettsäuren durch Luftsauerstoff zu vermeiden; im Menschen ist  $\alpha$ -Tocopherol das wichtigste fettlösliche Antioxidans. Es wird angenommen, daß die Tocopherole durch diese Funktion als Antioxidantien zur Stabilisierung biologischer Membranen beitragen, da durch den Schutz der ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide die Membran-Fluidität aufrechterhalten wird. Jüngeren Erkenntnissen zufolge kann darüber hinaus mit der regelmäßigen Zufuhr relativ hoher Tocopherol-Dosen der Ausbildung der Arteriosklerose entgegengewirkt werden. Als weitere günstige physiologische Eigenschaft der Tocopherole wurde die Verzögerung Diabetes bedingter Spätschäden, die Verminderung des Risikos der Kataraktbildung, Verminderung des oxidativen Stresses bei Rauchern, anticarcinogene Effekte, protektive Wirkung gegen Hautschäden wie Erythreme und Hautalterung, etc. beschrieben.

25

- Wegen ihrer oxidationshemmenden Eigenschaften werden die Tocopherole nicht nur lebensmitteltechnologisch genutzt, sondern auch in auf natürlichen Ölen basierenden Anstrichfarben, in Desodorantien und anderen Kosmetika, beispielsweise Sonnenschutzmittel, Hautpflegemitteln, Lippenstiften etc. eingesetzt.
- 5 Dabei sind Tocopherolverbindungen wie Tocopherylacetat und -succinat die üblichen Applikationsformen für die Anwendung als Vitamin E, in durchblutungsfördernden und Lipid-senkenden Mitteln und veterinärmedizinisch als Futtermittelzusatz.
- 10 In der Biosynthese der Tocopherole, insbesondere des  $\alpha$ -Tocopherols, scheint Phytylpyrophosphat ein limitierender Faktor zu sein. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, daß PPP durch sequentielle Hydrogenierung der Isoprenoidgruppe aus GGPP hervorgeht, wobei als Intermediate Dihydro-GGPP und Tetrahydro-GGPP entstehen (GGPP  $\rightarrow$  Dihydro-GGPP  $\rightarrow$  Tetrahydro-GGPP  $\rightarrow$  PPP; vgl. bspw. Bollivar *et al.* (1994) Biochemistry 33, 12763-12768).
- 15
- Die schrittweise Hydrogenierung von GGPP zu PPP wird, so wird gegenwärtig angenommen, durch das Enzym Geranylgeranyl-Reduktase (GGPP-Reduktase, auch als Geranylgeranyl-pyrophosphat-Hydrogenase bzw. GGPP-Hydrogenase
- 20 bezeichnet) katalysiert, das in Pflanzen im Gen *Chl P* kodiert wird. Das Enzym Geranylgeranyl-Reduktase gehört zum Isoprenoidstoffwechsel und fungiert für zwei Stoffwechselwege: die Tocopherolsynthese und die Chlorophyllsynthese.
- Die essentielle Bedeutung dieses Enzyms ist erstmals für die Chlorophyllbiosynthese gezeigt worden (Benz *et al.* (1980) Plant Sci. Lett. 19, 225-230; Soll and Schultz (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 907-912; Schoch *et al.* (1977) Z. Pflanzenphysiol. 83, 427-436). Der letzte Schritt der Chlorophyllbiosynthese ist die Veresterung von Chlorophyllid, die sowohl mit Phytylpyrophosphat als auch mit Geranylgeranyl-pyrophosphat erfolgen kann. Systema-
- 25

tische Untersuchungen von *Rhodobacter capsulatus*-Mutanten haben zeigen können, daß zuerst Bacteriochlorophyllid mit GGPP verestert und nachfolgend esterifiziertes Chlorophyll-GG hydrogeniert wird (Katz *et al.* (1972) J. Am. Chem. Soc. 94, 7938-7939). In höheren Pflanzen wird größtenteils Phytyl-Chlorophyll (Chlorophyll-P) nachgewiesen (Rüdiger and Schoch (1991) in Chlorophylls (Scheer, H., Ed.) pp. 451-464, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA). Es ist bisher nicht geklärt, mit welchen Substraten die Reduktase-Reaktion in Pflanzen erfolgt. Gegenwärtig wird angenommen, daß die pflanzliche Geranylgeranyl-Reduktase in der Lage ist, sowohl Chlorophyll-GG in Chlorophyll-P umzuwandeln (Schoch *et al.* (1978) Z. Pflanzenphysiol. 83, 427-436) als auch GGPP zu PPP zu hydrogenieren, das dann anschließend mit Chlorophyllid verbunden wird (Soll *et al.* (1983) Plant Physiol. 71, 849-854).

GGPP dient als Substrat für die Synthesewege des Tocopherols und des Phyllochinons in Chloroplastenhüllmembranen und für die Chlorophyllsynthese in den Thylakoidmembranen. Die Reduktion von GGPP zu PPP wurde erstmals 1983 von Soll *et al.* beschrieben (1983, Plant. Physiol. 71, 849-854). Bisher ist allerdings die Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuresequenzen, die für das pflanzliche Enzym kodieren und für die Beeinflussung des Tocopherolgehaltes in transgenen Pflanzen eingesetzt werden können, nicht gelungen.

Die essentielle Rolle der Geranylgeranyl-Reduktase im Tocopherol- und Chlorophyllstoffwechsel macht dieses Enzym zu einem besonders wertvollen Instrument für die molekulare Biotechnologie. Mit Hilfe molekularbiologischer Techniken wie der Übertragung von DNA-Sequenzen, die für Geranylgeranyl-Reduktase kodieren, könnten in Pflanzen Änderungen in der Tocopherol- und/oder Chlorophyllbiosyntheseleistung erzielt werden. Auf diese Weise wäre z.B. die Erzeugung von transgenen Pflanzen mit erhöhtem oder verringertem Tocopherolgehalt möglich. Solche transgenen Pflanzen bzw. deren Teile, Zellen und/oder

- 5 -

- Produkte könnten anschließend als Nahrungs- und Futtermittel bzw. allgemein als Produktionsstätte für Tocopherol, das in der chemischen, pharmazeutischen und kosmetischen Industrie Anwendung findet, eingesetzt werden.
- 5      Darüber hinaus ist davon auszugehen, daß Pflanzen, die einen gegenüber Wildtyp-  
pflanzen erhöhten Gehalt an antioxidativ wirksamen Tocopherolen aufweisen, auch  
eine erhöhte Resistenz gegenüber Streßbedingungen, insbesondere gegenüber oxi-  
dativem Streß, aufweisen.
- 10     Es ist daher Aufgabe der Erfindung, neue Nukleinsäuresequenzen bereitzustellen,  
mit deren Hilfe in Pflanzen, Pflanzenzellen, -teilen und/oder -produkten der Gehalt  
an Tocopherol beeinflußt werden kann.
- 15     Des weiteren ist es eine wichtige Aufgabe der Erfindung, transgene Pflanzen, -  
zellen, -produkte und -teile mit gegenüber Wildtyppflanzen verändertem Toco-  
pherolgehalt bereitzustellen.
- 20     Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Möglichkeiten der Verwendung  
der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, deren Genprodukte sowie der  
erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen für die pflanzenzüchterische Praxis  
aufzuzeigen.
- 25     Weitere Aufgaben der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung.  
Diese Aufgaben werden durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche,  
insbesondere basierend auf der Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-  
Sequenzen, deren Genprodukte unmittelbar an der Tocopherolbiosynthese beteiligt  
sind, und der in einem veränderten Tocopherolgehalt resultierenden Übertragung  
dieser DNA-Sequenzen auf Pflanzen, gelöst.



Die vorliegende Erfindung betrifft somit DNA-Sequenzen, die für Proteine mit der biologischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase (auch Geranylgeranyl-pyrophosphat-Hydrogenase genannt) oder ein biologisch aktives Fragment davon kodieren. Biologisch aktives Fragment bedeutet im Zusammenhang mit dieser Erfindung, daß die vermittelte biologische Aktivität zu einer Beeinflussung des Tocopherolgehalts ausreicht. Insbesondere betrifft die Erfindung pflanzliche DNA-Sequenzen, die für Proteine mit der biologischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder ein biologisch aktives Fragment davon kodieren, besonders bevorzugt betrifft die Erfindung die in SEQ:ID NO. 1 angegebene DNA-Sequenz (s. auch Abb. 1).

Des weiteren betrifft die Erfindung Allele und Derivate der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die für ein Protein mit der biologischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase kodieren, insbesondere Nukleinsäuremoleküle, deren Sequenzen sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen unterscheiden und die für ein Protein oder ein Fragment davon kodieren, das die biologische Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase aufweist.

Des weiteren betrifft die Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen enthalten oder durch natürlich vorkommende oder durch gentechnische oder chemische Prozesse und Syntheseverfahren aus diesen entstanden sind bzw. von diesen abgeleitet wurden. Hierbei kann es sich beispielsweise um DNA- oder RNA-Moleküle, cDNA, genomische DNA, mRNA etc. handeln.

Die Erfindung betrifft auch solche Nukleinsäuremoleküle, in denen die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit regulatorischen Elementen verknüpft sind, die die Transkription und, falls erwünscht, Translation in der Pflanzenzelle gewährleisten.



So können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen beispielsweise unter Kontrolle konstitutiver, aber auch induzierbarer oder gewebe- bzw. entwicklungsspezifischer Regulationselemente, insbesondere Promotoren, in Pflanzenzellen exprimiert werden. Während beispielsweise die Verwendung eines induzierbaren Promotors die gezielt ausgelöste Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in Pflanzenzellen ermöglicht, bietet z.B. der Einsatz von gewebespezifischen, beispielsweise samenspezifischen, Promotoren die Möglichkeit, den Tocopherolgehalt in bestimmten Gewebe, beispielsweise in Samengewebe zu verändern. So liegen die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in einer bevorzugten Ausführungsform in Kombination mit gewebespezifischen Promotoren, insbesondere samenspezifischen Promotoren, vor.

Die Erfindung betrifft weiterhin Proteine mit der biologischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder aktive Fragmente davon, die durch eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kodiert werden. Vorzugsweise handelt es sich um eine pflanzliche Geranylgeranyl-Reduktase, bevorzugt aus *Nicotiana tabacum*, besonders bevorzugt um ein Protein mit der in SEQ:ID No. 2 (s. auch Abb. 2) gezeigten Aminosäuresequenz oder ein aktives Fragment davon.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Vektoren und Mikroorganismen zu liefern, deren Verwendung die Herstellung neuer Pflanzen, in denen ein veränderter Tocopherolgehalt erzielt werden kann, ermöglicht. Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Vektoren und Mikroorganismen gelöst, die für Enzyme mit der Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren,

die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten und gegebenenfalls für den Transfer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auf Pflanzen bzw. Pflanzenzellen eingesetzt werden können.

5 Ebenso betrifft die Erfindung transformierte Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren, Pilze, Hefen etc., die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nukleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und ggf. Translation in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen gewährleisten.

15 Gegebenenfalls können die Nukleinsäuresequenzen der Erfindung durch Enhancer-Sequenzen oder andere regulatorische Sequenzen ergänzt sein. Diese regulatorischen Sequenzen beinhalten z.B. auch Signalsequenzen, die für den Transport des Genprodukts zu einem bestimmten Kompartiment sorgen.

20 Es ist ebenso eine Aufgabe der Erfindung neue Pflanzen, Pflanzenzellen, -teile oder -produkte bereitzustellen, die sich durch einen veränderten Tocopherolgehalt auszeichnen, der ggf. mit einer gegenüber Wildtyppflanzen veränderten Chlorophyllbiosyntheseleistung gekoppelt sein kann.

25 Diese Aufgaben werden durch die Übertragung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle und ihre Expression in Pflanzen gelöst. Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle besteht nun die Möglichkeit, pflanzliche Zellen mittels gentechnischer Methoden dahingehend zu verändern, daß sie im Vergleich zu Wildtypzellen eine neue oder veränderte Geranylgeranyl-

- Reduktase-Aktivität aufweisen und es als Folge dazu zu einer veränderten Tocopherolbiosyntheseleistung und zu einem veränderten Tocopherolgehalt kommt.
- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um Pflanzen bzw. deren Zellen und Teile, in denen der Tocopherolgehalt aufgrund der Gegenwart und Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle gegenüber Wildtyppflanzen erhöht ist.
- 10 Die Erfindung betrifft aber auch solche Pflanzen, in denen die Übertragung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zu einer Verringerung des Tocopherol- und/oder Chlorophyllgehalts führt. Eine reduzierte Tocopherol- und/oder Chlorophyllbiosyntheseleistung kann beispielsweise durch den Transfer von antisense-Konstrukten oder andere Suppressionsmechanismen, wie beispielsweise
- 15 Cosuppression, erreicht werden.
- Gegenstand der Erfindung sind weiterhin transgene Pflanzenzellen bzw. solche Pflanzenzellen umfassende Pflanzen und deren Teile und Produkte, in denen die neuen Nukleinsäuremoleküle integriert in das pflanzliche Genom vorliegen.
- 20 Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Pflanzen, in deren Zellen die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz in selbstreplizierender Form vorliegt, d.h. die Pflanzenzelle enthält die fremde DNA auf einem eigenständigen Nukleinsäuremolekül.
- 25 Bei den Pflanzen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäure-molekülen transformiert sind und in denen aufgrund der Einführung eines solchen Moleküls eine veränderte Menge an Tocopherol und/oder Chlorophyll synthetisiert wird, kann es sich im Prinzip um jede beliebige Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder dikotyle Nutzpflanze. Beispiele für monokotyle Pflanzen

sind die Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) gehören. Bei den dicotylen Nutzpflanzen sind u.a. zu nennen Leguminosen, wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Zierpflanzen, Bäume. Weitere Nutzpflanzen können beispielsweise Obst (insbesondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas und Bananen), Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher, Tabak, Sisal, Baumwolle, Lein, Sonnenblume sowie Heilpflanzen und Weidegräser und Futterpflanzen sein. Besonders bevorzugt sind die Getreide, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Reis, Mais und Hirse, Futtergetreide, Zuckerrübe, Raps, Soja, Tomate, Kartoffel, Süßgräser, Futtergräser, und Klee. Es ergibt sich von selbst, daß die Erfindung insbesondere übliche Nahrungs- bzw. Futterpflanzen betrifft. Hier sind neben den bereits erwähnten Pflanzen zusätzlich Erdnuß, Linse, Ackerbohne, Runkelrübe, Buchweizen, Möhre, Sonnenblume, Topinambur, Rübsen, Weißer Senf, Kohlrübe und Stoppelrübe zu nennen.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Vermehrungsmaterial von erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstöcke etc., wobei dieses Vermehrungsmaterial gegebenenfalls oben beschriebene transgene Pflanzenzellen enthält, sowie Teile dieser Pflanzen wie Protoplasten, Pflanzenzellen und Kalli.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Pflanzenzellen, die aufgrund der Gegenwart und ggf. Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle einen im Vergleich zu Pflanzenzellen, die die Nukleinsäuremoleküle nicht enthalten, veränderten Gehalt an Vitamin K<sub>1</sub> aufweisen. Das fettlösliche Vitamin K<sub>1</sub>, das insbesondere in Pflanzen enthalten ist, hat eine wichtige Funktion bei der Bildung von Gerinnungsfaktoren, Mangel an Vitamin K<sub>1</sub> führt zu einer Verringerung der Blutgerinnung, weshalb es auch als antihämorrhagisches oder Koagulationsvitamin

- 11 -

bezeichnet wird. Da die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in einer veränderten Geranylgeranyl-Reduktase-Aktivität und demzufolge veränderten PPP-Syntheseleistung resultiert und das als Vitamin K<sub>1</sub> bezeichnete Phyllochinon, wie die Tocopherole, eine Einheit Phytol umfaßt, sind auch solche Pflanzenzellen bzw. Pflanzen Gegenstand der Erfindung, die einen veränderte Vitamin K<sub>1</sub>-Gehalt alleine oder in Kombination mit einem veränderten Tocopherolgehalt aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um transgene Pflanzenzellen bzw. Pflanzen und deren Teile und Produkte, die aufgrund der Gegenwart und ggf. Expression einer für eine Geranylgeranyl-Reduktase aus Pflanzen kodierenden DNA-Sequenz einen gegenüber nicht-transformierten Zellen veränderten Tocopherolgehalt aufweisen. Bevorzugt handelt es sich bei der in den Pflanzenzellen enthaltenen DNA-Sequenz um eine für Geranylgeranyl-Reduktase kodierende Sequenz, die aus Tabak stammt. Besonders bevorzugt handelt es sich um die in SEQ:ID NO. 1 dargestellte DNA-Sequenz (siehe auch Abb. 1). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kodieren die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen für ein Geranylgeranyl-Reduktase-Vorstufenenzym, das eine Transitsequenz für die Translokation in Plastiden umfaßt.

Die Erfindung betrifft des weiteren Pflanzen, in denen neben dem chl P-Gen zusätzlich ein Gen für Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPD) exprimiert wird. Das Enzym HPD katalysiert die Umsetzung von 4-Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisat, das wie oben erwähnt neben dem Phytol den zweiten Baustein der Tocopherole darstellt. Das Enzym HPD sowie seine Stellung im pflanzlichen Isoprenoid-Stoffwechsel sind *inter alia* in Norris *et al.* (1995) The Plant Cell 7, 2139-2149, beschrieben.

5 Durch die gemeinsame Expression, vorzugsweise Überexpression, von Sequenzen, die für Geranylgeranyl-Reduktase und HPD kodieren, kann der Tocopherolgehalt in transgenen Pflanzen gegenüber solchen Pflanzen, die nur die erfindungsgemäßen, für CHL P kodierenden Sequenzen enthalten, zusätzlich gesteigert werden.

10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische und eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen Nukleinsäuremolekül oder einem Vektor transformiert bzw. infiziert wurden, und Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen Nukleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten. Die Wirtszellen können Bakterien, Algen, Hefe- und Pilzzellen sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein. Gegenstand der Erfindung sind auch solche Wirtszellen, die neben den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen ein oder mehrere auf gentechnolo-

15 gischem oder natürlichem Weg übertragene Nukleinsäuremoleküle enthalten, die die genetische Information für an der Tocopherol-, Chlorophyll- und/oder Vitamin K<sub>1</sub>-Biosynthese beteiligte Enzyme tragen.

20 Der vorliegenden Erfindung liegt außerdem die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von Pflanzenzellen und Pflanzen, die sich durch einen veränderten Tocopherolgehalt auszeichnen, bereitzustellen.

25 Diese Aufgabe wird durch Verfahren gelöst, mit deren Hilfe die Erzeugung neuer Pflanzenzellen und Pflanzen, die aufgrund der Übertragung von für Geranylgeranyl-Reduktase kodierenden Nukleinsäuremolekülen einen veränderten Tocopherolgehalt aufweisen, möglich ist.

Des weiteren wird diese Aufgabe durch Verfahren gelöst, mit deren Hilfe die Erzeugung neuer Pflanzenzellen und Pflanzen möglich ist, die aufgrund der

- gemeinsamen Übertragung von für Geranylgeranyl-Reduktase kodierenden Nukleinsäuremolekülen und für HPD kodierenden Nukleinsäuremolekülen oder der Übertragung von für Geranylgeranyl-Reduktase und für HPD kodierenden Nukleinsäuremolekülen einen gegenüber Wildtyppflanzen veränderten Tocopherolgehalt aufweisen.

Zur Erzeugung solcher neuer Pflanzenzellen und Pflanzen bieten sich verschiedene Methoden an. Zum einen können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe herkömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart verändert werden, daß die neuen Nukleinsäuremoleküle in das pflanzliche Genom integriert werden, d.h. daß stabile Transformanten erzeugt werden. Zum anderen kann ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, dessen Anwesenheit und ggf. Expression in der Pflanzenzelle eine veränderte Tocopherolbiosyntheseleistung bewirkt, in der Pflanzenzelle bzw. der Pflanze als selbstreplizierendes System enthalten sein. So können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle z.B. in einem Virus enthalten sein, mit dem die Pflanze bzw. Pflanzenzelle in Kontakt kommt.

Erfindungsgemäß werden Pflanzenzellen, die aufgrund der Expression einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz einen veränderten Tocopherolgehalt aufweisen, durch ein Verfahren hergestellt, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Herstellung einer Expressionskassette, die folgende DNA-Sequenzen umfaßt:
  - einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
  - mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein oder ein Fragment mit der enzymatischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase kodiert, wobei die Nukleinsäuresequenz in Sense-Orientierung an das 3'-Ende des



- Promotors gekoppelt ist; und  
gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der  
Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das  
entsprechende  
5 Transkript, das an das 3'-Ende der kodierenden  
Region gekoppelt ist.
- b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt a)  
hergestellten Expressionskassette.
- 10 c) Regeneration transgener Pflanzen und gegebenenfalls die Vermehrung der  
Pflanzen.

Alternativ kann eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen als  
15 selbstreplizierendes System in die Pflanzenzelle bzw. Pflanze eingebracht werden.

Als weitere Alternative kann Schritt a) des obigen Verfahrens dahingehend abge-  
wandelt werden, daß die mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz,  
die für ein Protein oder ein Fragment mit der enzymatischen Aktivität einer  
20 Geranylgeranyl-Reduktase kodiert, in Antisense-Orientierung an das 3'-Ende des  
Promotors gekoppelt ist.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Verwendungen der erfindungs-  
gemäßen Nukleinsäuresequenzen sowie der sie enthaltenen Nukleinsäuremoleküle  
25 aufzuzeigen.

Diese Aufgabe wird durch die erfindungsgemäßen Verwendungen der neuen  
DNA-Moleküle zur Erzeugung von Pflanzenzellen und Pflanzen, die sich durch

- 15 -

einen im Vergleich zu Wildtypzellen bzw. -pflanzen veränderten, vorzugsweise erhöhten, Tocopherolgehalt auszeichnen, gelöst.

5 Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen zur Erzeugung von Pflanzen, die einen veränderten Chlorophyllgehalt aufweisen.

10 Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen zur Erzeugung von Pflanzen, die sich durch einen veränderten, vorzugsweise erhöhten, Gehalt an Vitamin K<sub>1</sub> auszeichnen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, die Möglichkeiten der Verwendung der erfindungsgemäßen Pflanzen bzw. deren Zellen, Teile und Produkte aufzuzeichnen.

15 Gegenstand der Erfindung ist insbesondere die Verwendung der erfindungsgemäßen Pflanzen als Futter- und/oder Nahrungspflanze. In Abhängigkeit von der erzielten Erhöhung des Gehalts an Vitamin E und/oder Vitamin K<sub>1</sub> in der transgenen Nutzpflanze bzw. deren Produkte und Teile kann eine sonst allgemein  
20 übliche und oft auch erforderliche Zumischung der entsprechenden Vitamine, insbesondere von Vitamin E, mengenmäßig beschränkt bzw. vollkommen überflüssig werden. Unabhängig davon betrifft die Erfindung allgemein die Erhöhung des Nährwerts von Nutzpflanzen durch eine Steigerung des Gehalts an Tocopherolen und/oder Phyllochinon.

25 Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, Pflanzen, deren Teile und Produkte, als Produktionsstätten für Vitamin E und/oder Vitamin K<sub>1</sub>. Neben ihrer Anwendung aufgrund ihres Vitamin-Charakters, beispielsweise in diätetischen und pharmazeutischen Produkten,

Kosmetika, Hautpflegeprodukten, allgemein zur Vitamin E-Supplementierung, etc., finden Tocopherole auch als Antioxidantien in chemischen Produkten wie beispielsweise Fetten und Ölen Anwendung. Die erfindungsgemäßen Pflanzen stellen somit eine wichtige Quelle für die Gewinnung von Tocopherolen und/oder Vitamin K<sub>1</sub> für ein breites Spektrum gewerblicher Zwecke dar.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Kombination mit samenspezifischen Promotoren zur Erzeugung von Pflanzen, bei denen sich vor allem das Samengewebe durch einen veränderten, vorzugsweise erhöhten, Tocopherolgehalt auszeichnet. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich um die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in Kombination mit dem USP- (Bäumlein *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 225, 459-467) oder Hordein-Promotor (Brandt *et al.* (1985) Carlsberg Res. Commun. 50, 333-345).

Diese genannten Promotoren, insbesondere die samenspezifischen Promotoren, eignen sich auch besonders für die gezielte Reduktion des Tocopherol- bzw. Chlorophyllgehalts in transgenen Samen unter Einsatz der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen im Zusammenhang mit der Antisense-Technik.

Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung eines Geranylgeranyl-Reduktase-Gens zur Erzeugung eines veränderten Tocopherolgehalts in Pflanzen.

Weiter betrifft die Erfindung die Verwendung eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase, um in Pflanzen einen veränderten Tocopherolgehalt zu erzielen.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, der erfindungsgemäßen Proteine mit Geranylgeranyl-

Reduktase-Aktivität und/oder der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen bzw. Wirtszellen mit neuer bzw. veränderter Geranylgeranyl-Reduktase-Aktivität zur Identifizierung neuer herbizider Wirkstoffe für den Pflanzenschutz. Dank der Schlüsselstellung der Geranylgeranyl-Reduktase innerhalb der Chlorophyll- und Tocopherolbiosynthese stellen die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und die durch sie kodierten Proteine ein äußerst wertvolles Target für die Herbizidforschung dar. So können beispielsweise die erfindungsgemäßen Proteine mit enzymatischer Geranylgeranyl-Reduktase-Aktivität für die Röntgenstrukturanalyse, NMR-Spektroskopie, molecular modeling, und drug design eingesetzt werden, um auf der Basis der aus diesen Verfahren gewonnenen Erkenntnisse Inhibitoren und/oder Effektoren der Geranylgeranyl-Reduktase und somit potentielle Herbizide zu identifizieren oder synthetisieren.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen zur Herstellung herbizidtoleranter Pflanzen. So können für Geranylgeranyl-Reduktase kodierende Sequenzen mittels Standard-Methoden verändert oder um neue Sequenzelemente erweitert werden und anschließend auf Pflanzenzellen übertragen werden. Die Einbringung von aus den erfindungsgemäßen Sequenzen abgeleiteten Sequenzen kann z.B. dazu genutzt werden, die Eigenschaften der Pflanzen dahingehend zu verändern, daß in der transgenen Pflanze mehr oder weniger funktionell aktive Geranylgeranyl-Reduktase oder eine Variante der Geranylgeranyl-Reduktase mit veränderten Eigenschaften gebildet wird oder daß das Expressionsniveau des in der transgenen Pflanze vorhandenen chl P-Gens vermindert wird. So kann mittels einer Erhöhung der CHL P-Aktivität eine Erhöhung der Toleranz gegenüber Herbiziden, welche die Chlorophyllbiosynthese inhibieren, erreicht werden. Ebenso kann z.B. die Expression veränderter Geranylgeranyl-Reduktase-Gene in transgenen Pflanzenzellen mit einer Erhöhung der Herbizidtoleranz verbunden sein.

- Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder eines durch sie kodierten Proteins zur Herstellung von Antikörpern.
- 5 Die vorliegende Erfindung umfaßt somit jede mögliche Form des Einsatzes der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, deren Gegenwart und ggf. Expression in Pflanzen eine Veränderung des Tocopherolgehalts und/oder Chlorophyllgehalts bewirkt, sowie des Einsatzes der erfindungsgemäßen Proteine oder Fragmente davon, deren enzymatische Aktivität eine solche Veränderung herbeiführt.
- 10 Für den genannten Promotor kommt im Prinzip jeder in den für die Transformation gewählten Pflanzen funktionale Promotor in Betracht, der die Bedingung erfüllt, daß die von ihm regulierte Expression zu einer veränderten Tocopherolsyntheseleistung führt. Im Hinblick auf die Verwendung der transgenen
- 15 Pflanzen als Nahrungs- bzw. Futterpflanzen erscheinen hierfür besonders solche Promotoren sinnvoll, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Beispiele für solche Promotoren sind der USP-Promotor, Hordein-Promotor und Napin-Promotor.
- 20 Falls solche Promotoren nicht bekannt sind oder nicht zur Verfügung stehen, ist auf jeden Fall das Konzept zur Isolierung solcher Promotoren dem Fachmann bekannt. Dabei wird in einem ersten Schritt aus Samengewebe die poly(A)<sup>+</sup> RNA isoliert und eine cDNA-Bank angelegt. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe von cDNA-Klonen, die auf poly(A)<sup>+</sup> RNA-Molekülen aus einem nicht aus Samen
- 25 stammenden Gewebe basieren, aus der ersten Bank mittels Hybridisierung diejenigen Klone identifiziert, deren korrespondierende poly(A)<sup>+</sup> RNA-Moleküle lediglich im Samengewebe exprimiert werden. Anschließend werden mit Hilfe dieser so identifizierten cDNA's Promotoren isoliert, die sodann für die Expression der hier beschriebenen kodierenden Nukleinsäuresequenzen verwendet

werden können. Analog können andere gewebespezifische oder entwicklungs-spezifische oder durch abiotische Stimuli induzierbare Promotoren isoliert und erfindungsgemäß eingesetzt werden.

5 Alternativ kann erstrebenswert sein, daß die Pflanze in vielen Bereichen aufgrund der Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle einen veränderten, vorzugsweise erhöhten Tocopherolgehalt aufweist. In diesem Fall bietet sich die Verwendung eines konstitutiven Promotors, beispielsweise des 35S RNA Promotors aus Cauliflower Mosaic Virus, an.

10 Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nukleinsäuremoleküle, die für Proteine mit der biologischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase kodieren oder biologisch aktive Fragmente davon und die mit einem der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle hybridisieren. Der Begriff biologisch aktive Fragmente  
15 bezieht sich auf Fragmente, die eine Veränderung des Tocopherolgehalts bewirken können. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind.  
20

Nukleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

25 Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nukleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook *et al.*, supra). Zur Identifizierung und Isolierung derartiger Nukleinsäuremoleküle können auch von

den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen abgeleitete Sequenzfolgen, beispielsweise degenerierte Oligonukleotidprimer, verwendet werden.

5 Somit betrifft die Erfindung ebenfalls die Verwendung einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder Teile davon zur Identifizierung und Isolierung homologer Sequenzen aus Pflanzen oder anderen Organismen.

10 Als Hybridisierungssonde können z.B. Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt oder im wesentlichen die oben aufgeführten Nukleotidsequenzen oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungssonde verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat  
15 man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz kodierten Proteine erforderlich. Hierzu stehen dem Fachmann eine Reihe von molekularbiologischen, biochemischen und biotechnologischen Standardverfahren zur Verfügung.

20 Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Moleküle, die für eine Geranylgeranyl-Reduktase kodieren oder ein biologisch, d.h. enzymatisch aktives Fragment davon. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nukleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um  
25 ein Polypeptid oder Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder einer vergleichbaren enzymatischen Aktivität, die einen veränderten Tocopherolgehalt bedingt, zu kodieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle an einer oder



mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, vorzugsweise über 80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen zu den oben  
5 beschriebenen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nukleinsäuremolekülen oder den durch sie kodierten  
10 Proteinen besteht. Bei den Nukleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natür-  
licherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus  
15 anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Modifikationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natür-  
lich auftretende als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante  
20 DNA-Techniken erzeugte Varianten handeln.

Üblicherweise weisen die von den verschiedenen Varianten und Derivaten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodierten Proteine bestimmte gemein-  
same Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht,  
25 immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören. Weitere gemeinsame Charakteristika können physikalische Eigenschaften wie z. B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität, pH-Optimum, Temperatur-

- 22 -

Optimum etc. darstellen. Des weiteren können natürlich die Produkte der von den Proteinen katalysierten Reaktionen gemeinsame oder ähnliche Merkmale aufweisen.

5 Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden  
10 Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analyseverfahren zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen  
15 Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation können die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

20 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel,  
25 die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Mikroinjektion und Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden *per se* keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist in der Regel die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

Je nach Einführungsmethode kann neben dem gewünschten Gen bzw. Gene die Anwesenheit weiterer DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- und Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters *et al.* (1978) Molecular and General Genetics 163, 181-

187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 515; Hoekema in: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985) Chapter V; Fraley *et al.* (1993) Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An *et al.* (1985) EMBO J. 4, 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blätter, Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensionskultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten können, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind bekannt (vgl. z.B. Wilmitzer L. (1993) Transgenic Plants, in: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.) Vol. 2, 627-659, V.C.H. Weinheim - New York - Basel - Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium*-basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 22, 491-506; Hiei *et al.* (1994) Plant J. 6, 271-282; Deng *et al.* (1990) Science in China 33, 28-34; Wilmink *et al.* (1992) Plant Cell Reports 11, 76-80; May *et al.* (1995) Bio/Technology 13, 486-492; Conner und Domiss (1992) Int. J. Plant Sci. 153, 550-555; Ritchie *et al.* (1993) Transgenic Res. 2, 252-265).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformationen mittels des biolistischen Ansatzes (Wan and Lemaux (1994) Plant Physiol. 104, 37-48; Vasil *et al.* (1993) Bio/Technology 11, 1553-1558; Ritala *et al.* (1994) Plant Mol. Biol. 24, 317-325; Spencer *et al.* (1990) Theor. Appl. Genet. 79, 625-631; Altpeter *et al.* (1996) Plant Cell Reports 16, 12-17), die Protoplasten-Transformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO 95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875; Fromm *et al.* (1990) Biotechnology 8, 833-844; Gordon-Kamm *et al.* (1990) Plant Cell 2, 603-618; Koziel *et al.* (1993) Biotechnology 11, 194-200). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen, granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito *et al.* ((1989) Bio/Technology 7, 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende

- Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer *in vitro* Kultivierungszeit von sieben bis acht Monaten erhalten Shillito *et al.* Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen.
- 5 Prioli und Söndahl ((1989) Bio/Technology 7, 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten, der Cateto-Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. vom Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donor-Zellen und von den Kulti-  
10 vierungsbedingungen, abhängig ist.
- Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, *supra*; Ritala *et al.*, *supra*) und für Weizen (Nehra *et al.* (1994) Plant J. 5, 285-297; Altpeter *et al.*, *supra*).
- 15 Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder  
20 einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.
- 25 Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick *et al.* (1986) Plant Cell Reports 5, 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt

- 27 -

- werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden.
- 5 Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.
- 10 Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für die neuen Nukleinsäuremoleküle homozygot sind und ihr phänotypisches Verhalten hinsichtlich eines veränderten Tocopherolgehalts untersucht und mit dem von hemizygoten Linien verglichen werden.
- 15 Die Expression der erfindungsmäßigen Proteine mit Geranylgeranyl-Reduktase-Aktivität kann mit Hilfe herkömmlicher molekularbiologischer und biochemischer Methoden erfolgen. Dem Fachmann sind diese Techniken bekannt und er ist problemlos in der Lage, eine geeignete Nachweismethode zu wählen, beispielsweise eine Northern Blot-Analyse zum Nachweis Geranylgeranyl-Reduktase-
- 20 spezifischer RNA bzw. zur Bestimmung der Höhe der Akkumulation von Geranylgeranyl-Reduktase-spezifischer RNA, eine Southern-Blot Analyse zur Identifizierung für Geranylgeranyl-Reduktase kodierender DNA-Sequenzen oder eine Western Blot-Analyse zum Nachweis des durch die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kodierten Proteins, vorzugsweise CHL P. Der Nachweis der enzymati-
- 25 schen Aktivität der Geranylgeranyl-Reduktase kann beispielsweise mit dem von Soll und Schultz (1981) in Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 907-912 beschriebenen Enzymassay über die Bildung von Chlorophyll-Phytyl erfolgen.



- 28 -

Die Erfindung basiert auf der erfolgreichen Isolierung eines für eine Geranylgeranyl-Reduktase kodierenden cDNA-Klons aus einer cDNA-Library aus *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1. Die Sequenz dieses cDNA-Klons, die einen vollständigen offenen Leserahmen umfaßt, ist in SEQ:ID NO. 1 dargestellt.

5 Unter Verwendung der Sequenz gemäß SEQ:ID No. 1 gelang die Erzeugung transgener Pflanzen, die einen gegenüber Wildtypfpflanzen veränderten Tocopherolgehalt aufweisen.

Der die DNA-Sequenz gemäß SEQ:ID NO. 1 enthaltende cDNA-Klon wurde in

10 *Escherichia coli* transformiert und der entsprechende *E. coli*-Stamm am 16.10.1997 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, unter der Hinterlegungsnummer DSM 11816 gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt.

15 Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

### BEISPIELE

20 Beispiel 1:  
Klonierung einer Tabak-cDNA, die eine Geranylgeranyl-Reduktase (CHL P) kodiert

Zur Identifizierung der Geranylgeranyl-Reduktase-cDNA aus Tabak wurde eine

25 Lambda ZAP II cDNA-Bibliothek (*Nicotiana tabacum* SR1, Stratagene, USA) unter Verwendung eines für den Locus 4D9T7P kodierenden EST aus *Arabidopsis thaliana* nach Vorschrift gescreent. Die verwendete EST-Sequenz weist eine Ähnlichkeit zu den bekannten bch P/chl P-Sequenzen aus *Rhodobacter capsulatus* (Young *et al.* (1989) Mol. Gen. Genet. 218. 1-12; Bollivar *et al.* (1994) J. Mol.

Biol. 237, 622-640; Bollivar *et al.* (1994) Biochemistry 33, 12763-12768) und *Synechocystis PCC6803* (Addlesee *et al.* (1996) FEBS Lett. 389, 126-130) auf.

Die verwendete Hybridisierungssonde umfaßt den Bereich der in 4D9T7P  
(Accession No. T04791) dargestellten EST-Sequenz von Base 1 bis Base 364. Die  
Sonde wurde als NotI/SalI-Restriktionsfragment aus der PRL2-Library von *A.*  
*thaliana* (Vektor:  $\lambda$ ZipLox) (Newman *et al.* (1994) Plant Physiol. 106:1241-1255)  
isoliert und mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP mittels Nicktranslation (Life Technologies,  
Eggenstein) radioaktiv markiert.

10

Die Hybridisierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

- 2 h Vorhybridisierung bei 55 °C mit Hybridisierungslösung folgender  
Zusammensetzung: 5 x SSC, 0,1 % SDS, 5 x Denhardt reagenz, 100  
 $\mu$ g/ml denaturierte Salmonsperm-DNA;
- 15 - 12 h Haupthybridisierung bei 55 °C mit frischer Hybridisierungslösung  
der oben genannten Zusammensetzung plus radioaktiv markierte Sonde;
- Waschen: 2 x 10 min. bei 55 °C mit 2 x SSC und 0,1 % SDS, und  
1 x 5 min. bei 55 °C mit 1 x SSC und 0,1 % SDS.

20

Die nach cDNA-Bank-Screening isolierte Plasmid-DNA wurde sequenziert. Die  
identifizierte und in SEQ:ID NO. 1 dargestellte chl P-cDNA-Sequenz umfaßt 1510  
Nukleotide (ohne polyA-Schwanz), von denen die Nukleotide 1 bis 1392 für ein  
52 kDa-Protein von 464 Aminosäuren (einschließlich des Start-Methionins, und  
ohne das Stopkodon (Nukleotide 1393 bis 1395) gerechnet) kodieren. Die abge-  
leitete Aminosäuresequenz des CHL P ist in SEQ:ID NO. 2 gezeigt. Die in  
25 SEQ:ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz umfaßt einen 3' untranslatierten Bereich  
von Nukleotid 1396 bis 1510.

- 30 -

Zur DNA-RNA-Isolierung, Sequenzanalyse, Restriktion, Klonierung, Gelelektrophorese, radioaktive Markierung, Southern, Northern und Western Blot Analysen, Hybridisierung und dergleichen wurden gängige Methoden angewandt, wie sie in einschlägigen Laborhandbüchern, wie Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind.

Beispiel 2:

10 Transformation von Tabakpflanzen und Regeneration intakter Pflanzen

Für die Herstellung transgener Pflanzen, die CHL P überexprimieren und daher einen gegenüber nicht-transformierten Pflanzen erhöhten Tocopherolgehalt aufweisen, wurde die DNA-Sequenz gemäß SEQ:ID NO. 1 mittels der Restriktionsenzyme BamHI und SalI in der multiplen Klonierungsschnittstelle des pBluescript-Vektors aus dem Vektor herausgeschnitten und in Sense-Orientierung in den binären Vektor BinAR-TX (Höfgen and Willmitzer (1990) Plant Science 66, 221-230), einem pBIB-Abkömmling (Becker (1990) Nucleic Acid Res. 18, 203), der mit den selben Restriktionsendonukleasen verdaut wurde, hinter den CaMV 35S-Promotor hineinligiert. Zur Verdeutlichung ist eine Restriktionskarte des Vektors BinAR-TX als Abbildung 3 beigelegt.

Anstelle des genannten binären Vektors BinAR-TX kann jeder beliebige für die Pflanzentransformation geeignete Vektor für die Herstellung eines chimären Gens, bestehend aus einer Fusion des CaMV 35S-Promotors oder eines anderen Promotors, der die Transkription und Translation in Pflanzenzellen gewährleistet, und DNA-Sequenzen, die für CHL P kodieren, verwendet werden.

Der rekombinante Vektor pCHLPbin wurde sodann in Agrobacterium tumefaciens (Stamm GV2260; Horsch *et al.* (1985) Science 227, 1229-1231) transformiert und zur Transformation von Tabakpflanzen (SNN) mittels der Blattscheiben-Transformationstechnik (Horsch *et al.*, supra) eingesetzt.

5

Hierzu wurde eine Übernachtskultur des entsprechenden *Agrobacterium tumefaciens*-Klons für 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert, und die Bakterien wurden in 2YT-Medium resuspendiert. Junge Tabakblätter einer Sterilkultur (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurden in kleine, ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke zerschnitten und kurzzeitig in die Bakteriensuspension gelegt. Die Blattstücke wurden anschließend auf MS-Medium (Murashige und Skoog (1962) Physiol. Plant. 15, 473; 0,7 % Agar) gelegt und zwei Tage im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke zur Sproßinduktion auf MS-Medium (0,7 % Agar) mit 1,6 % Glukose, 1 mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,2 mg/l Naphthyl-essigsäure, 500 mg/l Claforan (Cefotaxim, Hoechst, Frankfurt) und 50 mg/l Kanamycin gelegt. Das Medium wurde alle sieben bis zehn Tage gewechselt. Wenn sich Sprosse entwickelt hatten, wurden die Blattstücke in Glasgefäße, die dasselbe Medium enthielten, überführt. Entstehende Sprosse wurden abgeschnitten und auf MS-Medium mit 2 % Saccharose und 250 mg/l Claforan gegeben und zu ganzen Pflanzen regeneriert.

15

20

### Beispiel 3:

Analyse transgener Tabakpflanzen, die den rekombinanten Vektor pCHLPbin enthalten

25

Transgene Tabakpflanzen wurden wie oben beschrieben transformiert, selektioniert und regeneriert. Nach Bewurzelung in Sterilkultur wurden ca. 100 unabhängige Transformanten im Gewächshaus in Erde überführt. Die Tabakpflanzen wurden im

Gewächshaus bei 60 % Luftfeuchtigkeit und 20-25 °C für 16 Stunden im Licht und 18-20 °C für 8 Stunden in Dunkelheit gehalten.

5 Die Transformanten mit normalen oder erhöhten Tocopherol- bzw. Chlorophyllgehalten zeigten weder hinsichtlich ihres Phänotyps ein verändertes Aussehen noch eine im Vergleich zu Kontrollpflanzen veränderte Wachstumsrate.

10 Einige der Primärtransformanten zeigten einen gegenüber Wildtyppflanzen bis zu 4- bis 6fach-gesteigerten Tocopherolgehalt. Diese Steigerung des Tocopherolgehalts konnte in Nachkommen der T1- und T2-Generation und in homozygoten Tochterpflanzen, die durch übliche Selbstbestäubung und anschließende Bestimmung des Aufspaltungsmusters der Samen auf Kanamycin-haltigem Medium gewonnen wurden, zusätzlich erhöht werden.

15 Des weiteren konnte beobachtet werden, daß die Tocopherolgehalte in transgenen Pflanzen unter Streßbedingungen, wie z.B. Anzucht unter tiefen und erhöhten Temperaturen bzw. Starklicht, und in seneszenten Blättern gegenüber Kontrollpflanzen zusätzlich erhöht waren.

20 Die Bestimmung des Tocopherolgehalts erfolgte nach folgendem Protokoll: Blattscheiben wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert und dreimal in Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden gesammelt und auf einer LiCrospher 100 HPLC RP-18-Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei einem Fluß von 1 ml/min mit folgendem Gradienten eluiert: 94 % Laufmittel B (100 % Methanol) /  
25 6 % Laufmittel A (30 % Methanol, 10 % 0,1 M Ammoniumacetat, pH 5,1) für 7 min., für weitere 17 min. 99 % Laufmittel B / 1 % Laufmittel A, dann weitere 26 min. 94 % Laufmittel B / 6 % Laufmittel A.

Alternativ wurden die gesammelten Extrakte mittels HPLC in einem isokratischen Gradienten analysiert (Gradient besteht zu 2 % aus Lösung A [10 % Methanol und 10 % Essigsäure] und zu 98 % aus Methanol (Lösung B); Flußrate 1 ml/min.). Es wurde eine Waters LC-Modul-Anlage mit Shimadzu RF 551 Fluoreszenzdetektor  
5 (295 nm<sub>ex</sub>, 325 nm<sub>em</sub>) verwendet.

Das Ergebnis eines Tocopherolassays ist in Abbildung 4 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Der Vergleich der Blätter 6, 9, 12 (gezählt von der Pflanzenspitze) von den Transformanten 28 und 30 mit den entsprechenden  
10 Blättern der Kontrollpflanze (SNN) belegt einen bis zu 6-fach gesteigerten Gehalt an Tocopherol in den transgenen Linien.

Unabhängig von ihrer Fähigkeit, auf Kanamycin-haltigem Medium zu wachsen, wurden die transgenen Tabakpflanzen auch im Southern Blot analysiert. Hierbei  
15 ergaben sich nach Hybridisierung mit einem markierten cDNA-Fragment für CHL P zusätzliche radioaktiv-markierte Banden der mit Restriktionsenzymen verdauten genomischen DNA der Transformanten im Vergleich zu Kontrollpflanzen

Eine Northern Blot-Analyse ergab eine gegenüber den CHL P-RNA-Gehalten der  
20 Kontrollpflanzen erhöhte Menge an spezifischer RNA in den Transformanten.

Eine erhöhte Geranylgeranyl-Reduktase-Expression in den transgenen Pflanzen konnte auch im Western Blot nachgewiesen werden. Die Transformanten zeigten gegenüber Kontrollpflanzen eine erhöhte Menge an CHL P-Protein.  
25

Zusätzlich konnte in Plastiden-Importexperimenten (durchgeführt nach Grimm *et al.* (1989) Plant Mol. Biol. 13, 583-593) bestätigt werden, daß das durch die Sequenz gemäß SEQ:ID NO. 1 kodierte CHL P-Vorstufenprotein nach *in vitro*-Transkription und -Translation in die Plastiden importiert wurde.

## Beispiel 4:

## Herstellung von CHL P-Antisense-Konstrukten und Übertragung auf Tabak

- 5 Während die in den Beispielen 2 und 3 erzeugten und analysierten transgenen Pflanzen einen aufgrund der Überexpression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen erhöhten Tocopherolgehalt aufwiesen, wurde für die Herstellung von transgenen Tabakpflanzen, die eine reduzierte Aktivität von CHL P aufweisen, folgendes Antisense-Konstrukt erzeugt und auf Tabak übertragen.
- 10 Die cDNA-Sequenz gemäß SEQ:ID NO. 1 wurde mittels der Restriktionsenzyme KpnI und XbaI in der multiplen Klonierungsschnittstelle des pBluescript-Vektors aus dem Vektor herausgeschnitten und in Antisense-Orientierung in den binären Vektor BinAR-TX (siehe Beispiel 2), der mit den selben Restriktionsenzymen ver-
- 15 daut wurde, mit dem 35S-Promotor von Cauliflower Mosaic Virus fusioniert. Der hieraus resultierende rekombinante Vektor pCHLPASbin wurde wie in Beispiel 2 beschrieben mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Leaf Disc-Transformation auf Tabak übertragen. Anschließend wurden transgene Pflanzen regeneriert. Ungefähr 100 unabhängige transgene Linien wurden regeneriert und
- 20 die Insertion von Kopien des Transgens mittels üblicher Verfahren (z.B. Southern Blot-Hybridisierung) bestätigt.

- Die Transformanten zeigten einen im Vergleich zu Kontrollpflanzen verminderten Wuchs, einen ausgebleichten Phänotyp, reduzierte RNA- und Proteingehalte für
- 25 CHL P, einen hohen Gehalt an Geranylgeranyl-Chlorophyll (bis zu 50% des Gesamt-Chlorophyllgehalts im Vergleich zu 100% Phytyl-Chlorophyll der Wildtyppflanzen) sowie einen verminderten Chlorophyll- und Tocopherolgehalt.



## Beispiel 5:

Überexpression aktiver Geranylgeranyl-Reduktase in *Escherichia coli*

- Für die Herstellung von Expressionsklonen, die das rekombinante CHL P in *E. coli* überexprimieren, wurde der offene Leserahmen für ein vermutlich reifes (prozessiertes) Protein mittels der Oligonukleotid-Primer
- CSYN 1            5'-cgc cat ggg ccg caa tct tcg tgt tgc ggt-3' und
  - CSYN 2            5'-gca gat ctg tcc att tcc ctt ctt agt gca-3'
- von der DNA-Sequenz gemäß SEQ:ID No. 1 mittels PCR amplifiziert (1 min. 94 °C; 2 min. 60 °C; 3 min. 72 °C für 25 Zyklen). Das amplifizierte PCR-Fragment wurde aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen NcoI und BglII geschnitten und in den mit den selben Enzymen verdauten Expressionsvektor pQE60 (Qiagen, Hilden) hineinligiert. Hinter dem Initiationskodon ATG (Bestandteil der Erkennungssequenz für NcoI) folgte die kodierende *Chl P*-Sequenz, beginnend mit dem Nukleotid Nr. 148 des offenen Leserahmens der CHL P-cDNA-Sequenz. Daraus resultiert nach dem Methionin der Einbau eines Glycins (Aminosäure Nr. 50 des aus der cDNA-Sequenz übersetzten Proteins).
- Für die Expression des pflanzlichen CHL P wurden die *E. coli*-Stämme XL 1 Blue (Stratagene, LaJolla, CA, USA) oder SG 13009 (Gottesman *et al.* (1981) J. Bacteriol. 148, 265-273) mit dem rekombinanten Vektor transformiert. Nach Induktion der Transkription des rekombinanten Gens mittels IPTG wurde in den *E. coli*-Stämmen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 47 kDa exprimiert. Das Protein wurde in der pelletierbaren Fraktion des Bakterienextraktes nachgewiesen und aus dem Gesamtextrakt unter denaturierenden Bedingungen über eine Nickel-Affinitätssäule gemäß den Instruktionen des Anbieters (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

- 36 -

Das aufgereinigte Protein wurde zur Antikörperherstellung in Kaninchen injiziert.

Das Protein aus dem Gesamtextrakt besitzt eine Geranylgeranyl-Reduktase-Aktivität in einem kombinierten Enzymassay mit bakterieller Bacteriochlorophyllsynthase unter Verwendung von Chlorophyllid und GGPP. Der Enzymassay wurde gemäß dem Protokoll in Oster *et al.* (1997) J. Biol. Chem. 272, 9671-9676, durchgeführt.

Die Auftrennung von Chlorophyll-GG und Chlorophyll-Phytol erfolgte auf einer HPLC mit der RP 18-Säule unter Verwendung der Lösungsmittelgemische Lösung A (60% Aceton) und Lösung B (100% Aceton). Der Gradient an Lösungsmitteln wurde eingesetzt:  $t_0$  75% Lösung A und 25% Lösung B, 2 min.; innerhalb  $t_{2-4}$  auf 45% Lösung A und 55% Lösung B; innerhalb  $t_{4-13}$  auf 30% Lösung A und 70% Lösung B; innerhalb  $t_{13-17}$  auf 100% Lösung B;  $t_{17-21}$  100% Lösung B isokratisch; anschließend innerhalb von 5 min. auf 75% Lösung A und 25% Lösung B; dann weitere 5 min. 75% Lösung A und 25% Lösung B isokratisch. Zur Detektion der Tetrapyrrole wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet ( $\lambda_{ex}$  425 nm,  $\lambda_{em}$  665 nm).

Beispiel 6:

Co-Expression des CHL P-Gens und des HPD-Gens in *Nicotiana tabacum*

Mittels der Oligonukleotid-Primer

- hpdoli1 5'-tta ggt acc atg ggc cac caa aac gcc gcc gtt tca g-3'

und

- hpdoli2 5'-tga gtc gac cac aat cct tta gtt ggt tct tct tct tg-3'

wurde aus einer *Arabidopsis thaliana*-cDNA-Bibliothek die Sequenz der HPD-cDNA (Accession No.: AF 000228) zwischen Nukleotid 37 und 1404 amplifiziert,

kloniert und ansequenziert. Das Fragment wurde mit den Restriktionsendo-  
nukleasen KpnI und SalI geschnitten und in den KpnI/SalI-geschnittenen binären  
Vektor Bin-Hyg-TX hineinligiert. Bei dem Vektor Bin-Hyg-TX handelt es sich  
(wie bei dem in Beispiel 2 verwendeten Vektor BinAR-TX) um einen pBIB-  
5 Abkömmling (Becker, supra), der die Expression einer in die multiple  
Klonierungsstelle einligierten kodierenden Region unter Kontrolle des 35S RNA  
Promotors aus Cauliflower Mosaic Virus ermöglicht. Im Unterschied zu dem für  
die Expression des CHL P-Gens eingesetzten Vektors BinAR-TX, der in Pflanzen-  
zellen eine Selektion auf Kanamycin ermöglicht, trägt der binäre Vektor Bin-Hyg-  
10 TX ein Hygromycinresistenzgen als Selektionsmarker für Pflanzenzellen. Zur Ver-  
deutlichung ist eine Restriktionskarte des Vektors Bin-Hyg-TX als Abbildung 5  
beigefügt.

Anstelle des genannten binären Vektors Bin-Hyg-TX kann jeder beliebige für die  
15 Pflanzentransformation geeignete Vektor für die Herstellung eines chimären Gens,  
bestehend aus einer Fusion des CaMV 35S-Promotors oder eines anderen  
Promotors, der die Transkription und Translation in Pflanzenzellen gewährleistet  
und DNA-Sequenzen, die für HPD kodieren, verwendet werden.

20 Dann erfolgte die Übertragung des erhaltenen, rekombinanten Vektor  
pBinHygHPD auf Tabak SNN mittels *Agrobacterium tumefaciens* wie in obigem  
Beispiel 2 beschrieben, wobei transgene Tabakspresse auf Hygromycin-haltigem  
Medium selektiert wurden. Die nach Regeneration erhaltenen Pflanzen dienten als  
Kontrollpflanzen.

25 Zusätzlich wurden die in Beispiel 2 beschriebenen Transformanten 28 und 30 und  
wahlweise andere Transformanten, die das CHL P-Gen unter Kontrolle des 35S

RNA Promotors überexprimieren, mittels Leaf Disc Transformation mit dem rekombinanten Vektor pBinHygHPD transformiert und ganze Pflanzen unter Selektion auf Kanamycin und Hygromycin regeneriert.

- 5 In sämtlichen transgenen Pflanzen wurde die erfolgreiche Übertragung und Expression des chimären HPD-Gens durch geeignete Southern- und Northernblot-Experimente mit dem oben erwähnten PCR-Fragment für HPD als Sonde bestätigt.

10 Ein Vergleich der Tocopherolgehalte (Analyse wie in Beispiel 3) in Blättern von Pflanzen, die nur das CHL P-Gen exprimieren (siehe Beispiel 3, Transformanten 28 und 30), und solchen Pflanzen, die das HPD-Gen und das CHL P-Gen co-exprimieren (Transformanten 28+HPD und 30+HPD) zeigte, daß der Tocopherolgehalt durch die gleichzeitige Expression des Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens zusätzlich gesteigert werden konnte.

15

Alternativ können transgene Pflanzen, die sowohl das CHL P-Gen als auch das HPD-Gen exprimieren, auch durch Kreuzung homozygoter "CHL P-Linien" mit homozygoten "HPD-Linien" erhalten werden.

- 20 Eine zusätzliche Steigerung des Tocopherolgehalts in Doppeltransformanten (bzw. Doppelkreuzungen) ist unter Streßbedingungen (z.B. erhöhte Temperatur, Lichtstreß u.ä.) zu erwarten.

25 Neben den vorangehend beschriebenen Doppeltransformanten, die HPD und CHL P exprimieren, wurden auch transgene HPD-Linien auf ihren Tocopherolgehalt und den Einfluß von Streßbedingungen auf den Tocopherolgehalt untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Überexpression von HPD in Tabakblättern eine 2- bis

3-fache Steigerung des Tocopherolgehalts zur Folge hat und daß insbesondere die Werte unter Streßbedingungen gegenüber nichttransgenen Kontrollpflanzen ansteigen.

5 Abbildung 6 zeigt Tocopherolgehalte in den Blättern 4, 7 und 10 von 12 Wochen-  
alten transgenen Takaklinien (# 2, 6 und 33), die das Arabidopsis-Enzym  
Hydroxyphenyl-Pyruvat-Dioxygenase (HPD) überexprimieren, im Vergleich zu  
Kontrollpflanzen (SNN). Die Pflanzen wurden entweder bei 38 °C oder bei 10 °C  
10 und einer Lichtintensität von ca. 200  $\mu\text{mol Photonen/m}^2/\text{s}$  abgezogen. Tocopherol  
wird mit zunehmendem Blattalter in den Pflanzen verstärkt angereichert. Ins-  
besondere in den älteren Blättern steigt der Gehalt des Tocopherols in den unter  
38 °C angezogenen Pflanzen sehr viel steiler an und erreicht die zweifache Menge  
gegenüber den Kontrollpflanzen. Dagegen sind die Tocopherolgehalte in den  
Transformanten in der Kälte nur leicht gegenüber denen der Wildtyppflanzen  
15 erhöht.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß HPD bei erhöhtem Bedarf an Toco-  
pherolen, also insbesondere unter Streßbedingungen, die Regeneration dieser  
Antioxidantien in transgenen Pflanzen besonders begünstigt.

20

Beispiel 7:

Erhöhte Resistenz der transgenen Pflanzen gegenüber oxidativem Streß

25 Nach Beispiel 2 und 3 hergestellte transgene Pflanzen wurden in einem  
Blattscheiben-Inkubationsversuch auf den Einfluß inhibitorischer und oxidativer  
Substanzen untersucht. 15 Keimlinge wurden in 20 mM Kaliumphosphat-Puffer  
(pH 7,1) für 10 h im Licht inkubiert. Neben den Kontrollansätzen (Wasser)  
wurden die Pflanzen in Ansätzen mit 3,3  $\mu\text{M}$  (niedrige Konzentration = NK) oder

- 40 -

33  $\mu$ M (hohe Konzentration = HK) Acifluorfen (BASF, Ludwigshafen, Deutschland), einem Hemmstoff der Protoporphyrinogen-Oxidase, und in anderen Ansätzen mit 1,7  $\mu$ M (niedrige Konzentration = NK) oder 17  $\mu$ M (hohe Konzentration = HK) Bengalrosa (4,5,6,7-Tetrachlor-2',4',5',7'-tetraiodfluorescein, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland), einem Erzeuger von reaktiven Sauerstoffspezies, inkubiert. Der Gehalt an Tocopherol ist in den untersuchten transgenen Linien (28, 30) sowohl in den Puffer-Kontrollansätzen wie auch unter oxidativen Streßbedingungen gegenüber Wildtyppflanzen (SNN) jeweils um das 2- bis 3-fache erhöht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 veranschaulicht.

10

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich die erfindungsgemäßen Pflanzen dank ihres gegenüber Wildtyppflanzen erhöhten Tocopherolgehalts durch eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Streß auszeichnen. Ein erhöhter antioxidativer Schutz der zellulären Membranen vor reaktiven Sauerstoffspezies in den erfindungsgemäßen Pflanzen ist somit zu erwarten.

15

#### Beispiel 8:

#### Tocopherolgehalt in Samen von transgenen Pflanzen

20

Tocopherol wurde wie oben beschrieben aus Samen von transgenen Pflanzen extrahiert, die sich aufgrund der Expression von CHL P unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (vgl. Beispiel 2) durch einen im Vergleich zu Wildtyppflanzen erhöhten Tocopherolgehalt in Blättern auszeichnen. Die Ergebnisse der mittels HPLC durchgeführten Tocopherolquantifizierung sind im Vergleich zu Tabakkontrollpflanzen in Abbildung 8 dargestellt.

25

Neben  $\alpha$ -Tocopherol wurde auch  $\gamma$ -Tocopherol quantifiziert. Letzteres liegt grundsätzlich in Tabaksamen in größeren Mengen vor; das Verhältnis von  $\gamma$ -Tocopherol

zu  $\alpha$ -Tocopherol beträgt in Tabaksamen ca. 10:1. Die Gehalte an beiden Formen der Tocopherole, insbesondere  $\alpha$ -Tocopherol, sind im Vergleich zu den Kontrollpflanzen in den transgenen Pflanzen mit erhöhter Geranylgeranyl-Reduktase-Expression um das 2- bis 3-fache erhöht.

5

Diese Ergebnisse, die die Auswirkungen einer konstitutiven CHL P-Expression unter Kontrolle des 35S-Promotors auf den Tocopherolgehalt im Samen wiedergeben, zeigen deutlich, daß bei Einsatz eines samenspezifischen Promotors (bzw. eines in Samen induzierbaren Promotors) die Expression der Geranylgeranyl-Reduktase im Samen und hierdurch der Tocopherolgehalt in Samen von transgenen Pflanzen zusätzlich gesteigert werden kann.

10

Sollten in irgendeiner Weise molekularbiologische Arbeiten nicht hinreichend beschrieben worden sein, so wurden diese nach Standardmethoden, wie bei Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben, durchgeführt. Bezüglich der Transformation von Pflanzen wird auf allgemein bekannte Übersichtsartikel sowie auf die oben genannten Veröffentlichungen verwiesen.

15

20

BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

- Abbildung 1: SEQ:ID NO. 1 zeigt die Nukleotid-Sequenz einer chl P-cDNA der Geranylgeranyl-Reduktase (CHL P) aus *Nicotiana tabacum*.
- 5  
Abbildung 2: SEQ:ID NO. 2 zeigt eine Aminosäuresequenz des Enzyms CHL P aus *N. tabacum*, abgeleitet von der in Abbildung 1 gezeigten SEQ:ID NO.1.
- 10  
Abbildung 3: Restriktionskarte des für die Pflanzentransformation eingesetzten binären Vektors BinAR. BinAR (Höfgen and Willmitzer (1990) Plant Science 66, 221) ist ein Bin19-Derivat (Bevan (1984) Nucl. Acids Res. 12, 8711), das eine Expressionskassette für die konstitutive Expression von chimären Genen in Pflanzen enthält, wobei die Expressionskassette über die EcoRI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen von Bin19 kloniert ist. Die Kassette umfaßt ein 770 Bp.-EcoRI/HindIII-Fragment, das den CaMV 35S-Promotor, einen teilweisen pUC18-Polylinker und das Terminationssignal des Octopinsynthase-Gens (OCS) enthält. Für die Insertion kodierender Sequenzen eignen sich besonders die unikal
- 15  
20  
25  
Abbildung 4: Balkendiagramm, das den Tocopherolgehalt in den Blättern 6, 9, 12 (gezählt von der Pflanzenspitze) von transgenen Tabakpflanzen (Linien 28 und 30) versus den entsprechenden Blättern von Kontrollpflanzen (SNN) zeigt.



- Abbildung 5: Restriktionskarte des für die Pflanzentransformation eingesetzten binären Vektors Bin-Hyg-TX, bei dem es sich um ein pBIB-Derivat (Becker, supra; Bevan, supra) handelt, das eine Expressionskassette für die konstitutive Expression von chimären Genen in Pflanzen enthält. Für die Insertion kodierender Sequenzen eignen sich besonders die unikalen Schnittstellen des pUC18-Polylinkers, nämlich HpaI, KpnI, SmaI, XbaI und SalI. Als Pflanzenselektionsmarker trägt der binäre Vektor Bin-Hyg-TX ein Hygromycinresistenzgen.
- Abbildung 6: Säulendiagramm der Tocopherolgehalte in den Blättern 4, 7 und 10 in 12 Wochen-alten transgenen Linien (# 2, 6, 33), die das Arabidopsis-Enzym HPD überexprimieren, und in Kontrollpflanzen (SNN).
- Abbildung 7: Tocopherolgehalt in 12 Tage-alten Keimlingen, die während einer 10stündigen Belichtung in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,1, Kontrolle = Wasser), mit 3,3  $\mu$ M (NK) bzw. 33  $\mu$ M (HK) Acifluorfen oder mit 1,7  $\mu$ M (NK) bzw. 17  $\mu$ M (HK) Bengalrosa inkubiert wurden (SNN = Wildtyp-Kontrollpflanzen, 28 und 30 = transgene Linien).
- Abbildung 8: relative Werte an  $\alpha$ -Tocopherol und  $\gamma$ -Tocopherol in Samen von transgenen Tabakpflanzen (# 7, 39, 67, 96) und Wildtyp-tabakpflanzen (SNN). 100%  $\alpha$ -Tocopherol entspricht 6 ng/mg Samen; 100%  $\gamma$ -Tocopherol entspricht 62,8 ng/mg Samen.

ANSPRÜCHE

- 5           1. Nukleinsäuresequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit der Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder ein aktives Fragment davon kodiert.
2. Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein pflanzliches Protein kodiert.
- 10           3. Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein aus Tabak kodiert.
4. Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ:ID No. 1.
- 15           5. Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in dem Klon DSM 11816 enthalten ist.
- 20           6. Allele und Derivate der Nukleinsäuresequenz gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit der Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder ein aktives Fragment davon kodieren.
7. Nukleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt.
- 25           8. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1-6 in Kombination mit regulatorischen Elementen umfaßt, die die Transkription und Translation in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

9. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1-6 in Kombination mit Promotoren umfaßt, die die Transkription und Translation in Pflanzenzellen gewährleisten.

5

10. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen konstitutiven, induzierbaren, gewebespezifischen oder entwicklungsspezifischen Promotor handelt.

10

11. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Promotor um einen samenspezifischen Promotor handelt.

15

12. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 7-11, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich Enhancer-Sequenzen, für Signalpeptide kodierende Sequenzen oder andere regulatorische Sequenzen umfaßt.

20

13. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 7-12, in dem die kodierende Nukleinsäuresequenz in der Sense-Orientierung vorliegt.

14. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 7-12, in dem die kodierende Nukleinsäuresequenz in der Antisense-Orientierung vorliegt.

25

15. Protein mit der biologischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder ein aktives Fragment davon, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine DNA-Sequenz oder ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche kodiert wird.

16. Protein mit der biologischen Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder ein aktives Fragment davon, dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ:ID NO. 2 gezeigte Aminosäuresequenz oder Bereiche davon aufweist.

5 17. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1-14 enthält.

10 18. Transgene Pflanzen, die eine Nukleinsäuresequenz, eine davon abgeleitete Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1-14 enthalten, sowie Teile dieser Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, usw., sowie die Nachkommen dieser Pflanzen.

15 19. Pflanzen gemäß Anspruch 18, die einen gegenüber Wildtyppflanzen veränderten Tocopherolgehalt aufweisen.

20 20. Pflanzen gemäß Anspruch 19, die einen gegenüber Wildtyppflanzen erhöhten Tocopherolgehalt aufweisen.

21. Pflanzen gemäß Anspruch 18, die einen gegenüber Wildtyppflanzen veränderten Gehalt an Vitamin K<sub>1</sub> aufweisen.

25 22. Pflanzen gemäß Anspruch 21, die einen gegenüber Wildtyppflanzen erhöhten Gehalt an Vitamin K<sub>1</sub> aufweisen.

23. Pflanzen gemäß Anspruch 18, die einen gegenüber Wildtyppflanzen veränderten Chlorophyllgehalt aufweisen.

24. Pflanzen gemäß Anspruch 23, die einen gegenüber Wildtyppflanzen erhöhten Chlorophyllgehalt aufweisen.

25. Dikotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 18-24.

5

26. Pflanzen gemäß Anspruch 25, bei denen es sich um Nutzpflanzen, Nahrungs- und/oder Futterpflanzen, insbesondere Raps, Soja, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Klee, handelt.

10

27. Monokotyle Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 18-24.

28. Pflanzen gemäß Anspruch 27, bei denen es sich um Nutzpflanzen, Nahrungs- und/oder Futterpflanzen, insbesondere Getreide, wie Weizen, Gerste, Mais, Hafer, Roggen, Reis, Süß- und Weidegräser, handelt.

15

29. Pflanzen gemäß einem der Ansprüche 18-28, in denen eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1-6 integriert im Genom der Pflanze vorliegt, sowie Teile dieser Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, usw., sowie die Nachkommen dieser Pflanzen.

20

30. Transgene Pflanzenzellen, einschließlich Protoplasten, die eine Nukleinsäuresequenz, eine davon abgeleitete Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1-14 enthalten.

25

31. Pflanzenzellen gemäß Anspruch 30. einschließlich Protoplasten. die einen gegenüber nicht-transformierten Pflanzenzellen veränderten, insbesondere erhöhten, Tocopherol-, Vitamin K<sub>1</sub>- und/oder Chlorophyllgehalt aufweisen.

32. Pflanzen bzw. Pflanzenzellen gemäß einem der Ansprüche 18-31, die zusätzlich eine für Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierende Nukleinsäuresequenz enthalten.

5           33. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen gemäß einem der Ansprüche 18-32, folgende Schritte umfassend:

- a)       Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, bestehend aus den folgenden Bestandteilen, die in der 5'-3'-Orientierung aneinandergereiht sind:
- 10           -       ein in Pflanzen funktionsfähiger, insbesondere samenspezifischer, Promotor,
- mindestens eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder ein aktives Fragment davon kodiert und
- 15           -       gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entsprechende Transkript, sowie ggf. davon abgeleitete DNA-Sequenzen;
- 20       b)       Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und gegebenenfalls Integration der Nukleinsäuresequenz in das pflanzliche Genom,
- c)       falls erwünscht, Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und
- 25       gegebenenfalls Vermehrung dieser Pflanzen.

34. Verwendung einer Pflanze gemäß einem der Ansprüche 18-29 und 32 als Nahrungs- oder Futterpflanze.

35. Verwendung einer Pflanze gemäß einem der Ansprüche 18-29 und 32 als Produktionsstätte für Tocopherole und/oder Vitamin K<sub>1</sub>.

5 36. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz oder eines Nukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1-14 zur Identifizierung, Isolierung oder Amplifizierung einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer Geranylgeranyl-Reduktase oder ein aktives Fragment davon kodiert.

10 37. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, eines Nukleinsäuremoleküls oder eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 1-16 zur Herstellung von Antikörpern.

15 38. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz oder eines Nukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1-14 zur Herstellung transgener Pflanzen bzw. Pflanzenzellen.

20 39. Verwendung gemäß Anspruch 38, worin die Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einen veränderten Tocopherolgehalt aufweisen.

40. Verwendung gemäß Anspruch 38, worin die Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einen veränderten Chlorophyllgehalt aufweisen.

25 41. Verwendung gemäß Anspruch 38, worin die Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einen veränderten Vitamin K<sub>1</sub>-Gehalt aufweisen.

42. Verwendung gemäß Anspruch 38, worin die Pflanzen bzw. Pflanzenzellen eine gegenüber Wildtyppflanzen erhöhte Herbizidtoleranz aufweisen.

43. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 38-42, worin die Pflanzen bzw. Pflanzenzellen zusätzlich eine für Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodierende Nukleinsäuresequenz enthalten.

5           44. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, eines Nukleinsäuremoleküls, eines Proteins oder eines Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 1-17 zur Auffindung von Effektoren pflanzlicher Geranylgeranyl-Reduktase.



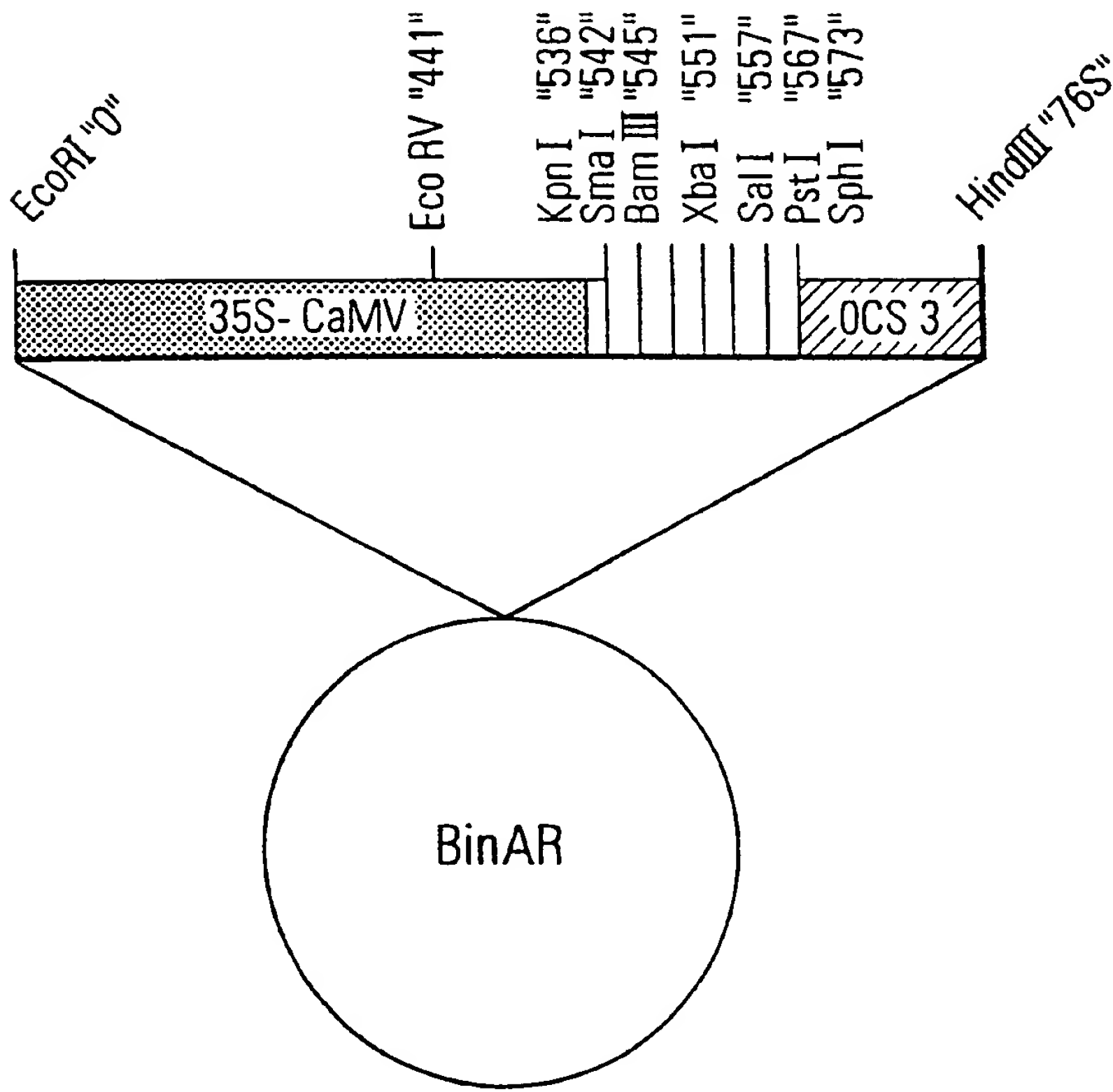
Abb. 1

ATGGCTTCCA TTGCTCTCAA AACTTTTACC GGCTCCGTC AATCCTCGCC GGAAACAAT  
TCCATTACTC TTTCTAAATC CCTCCCCTTC ACCCAAACCC ACCGTAGGCT CCGAATCAAT  
GCTTCCAAAT CCAGCCCAAG AGTCAACGGC CGCAATCTTC GTGTGCGGT GTGGGCGGT  
GGTCCTGCTG GTGGCGCCGC CGCTGAAACA CTCGCCAAGG GAGGAATTGA AACCTTCTTA  
ATCGAACGCA AATGGACAA CTGCAACCC TCGGTGGG CCATCCACT TTGCATGGTG  
GGAGAATTTG ACCTCCCTTT GGATATCATT GACCGGAAAG TTACAAAGAT GAAGATGATT  
TCCCCATCCA ACGTTGCTGT TGATATTGGT CAGACTTTAA AGCCTCACGA GTACATCGGT  
ATGGTGCGCC GCGAAGTACT CGATGCTTAC CTCCGTGACC GCGCTGCTGA AGCCGGAGCC  
TCTGTTCTCA ACGGCTTGTT CCTCAAAATG GACATGCCCA AAGCTCCCA CGCACCTTAC  
GTCCTTCACT ACACAGCTTA CGACTCCAAA ACTAATGGCG CGGGGAGAA GCGTACCTG  
GAAGTTGACG CCGTTATCGG CGCTGACGGT GCAAAATCCC GTGTCGCAA ATCCATAAAC  
GCCGGTGACT ACGAGTACGC TATTGCATTC CAAGAAAGGA TTAAATTTT CGATGATAAA  
ATGAAGTATT ACGAGAATT ACAGAAATG AGCTGAAATG TACGTGGGTG ATGACGTGTC CCCTGATTTT  
TACGGGTGGG TTTTCCCCAA ATGTGACCAC GTTGCCGTG GCACTGGCAC AGTCACCCAC  
AAAGCTGACA TCAAAAAATT CCAGCTAGCT ACAAGATTGA GAGCTGATTC CAAATCACCC  
GGCGGAAAAA TTATCCGGGT CGAGGCCAC CCGATTCCAG AACACCCAAG ACCCAGAAGA  
TTACAAGACA GAGTTGCATT GGTGGTGAT GCGGCAGGT ACGTGACCA ATGTTCGGGC  
GAAGGATTT ACTTCGCGC AAAGAGTGA CGTATGTGT CTGAAGCAAT TGTGAAGGG  
TCAGAAATGG GAAAAGAAAT GGTGGACGAG AGTGATTTGA GGAAGTATT GGAGAAATGG  
GACAAGACTT ATTGGCCAAC GTACAAGGT CTTGATATAT TGCAGAAAGT ATTTTACAGG  
TCGAATCCGG CGAGGGAAGC ATTTGTTGAA ATGTGCGCAG ATGAGTATGT GCAGAAGATG  
ACATTTGACA GCTATTTGTA CAAGAAAGTA GCACCAGGAA ACCCAATTGA AGACTTGAAG  
CTTGCTGTGA ATACCATTTG AAGTTTGGT AGAGCTAATG CACTAAGAAG GGAAATGGAC  
AAGCTCAGTG TATAAGAAGA TTAACAGCAT TAATATTTT TTGTAATTGA AGGATTTATT  
TCTCAAATTA CTCTGTAAAC ACCTTTCATC CTGCCTTTAA TCGGATTTAT GTAACTTCAT  
AATTGAGCT

**Abb. 2**

1	Met	Ala	Ser	Ile	Ala	Leu	Lys	Thr	Phe	Thr	Gly	Leu	Arg	Gln	Ser
16	Ser	Pro	Glu	Asn	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Pro	Phe
31	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Arg	Leu	Arg	Ile	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ser
46	Pro	Arg	Val	Asn	Gly	Arg	Asn	Leu	Arg	Val	Ala	Val	Val	Gly	Gly
61	Gly	Pro	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Ala	Lys	Gly	Gly
76	Ile	Glu	Thr	Phe	Leu	Ile	Glu	Arg	Lys	Met	Asp	Asn	Cys	Lys	Pro
91	Cys	Gly	Gly	Ala	Ile	Pro	Leu	Cys	Met	Val	Gly	Glu	Phe	Asp	Leu
106	Pro	Leu	Asp	Ile	Ile	Asp	Arg	Lys	Val	Thr	Lys	Met	Lys	Met	Ile
121	Ser	Pro	Ser	Asn	Val	Ala	Val	Asp	Ile	Gly	Gln	Thr	Leu	Lys	Pro
136	His	Glu	Tyr	Ile	Gly	Met	Val	Arg	Arg	Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr
151	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Asn	Gly
166	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Asp	Met	Pro	Lys	Ala	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr
181	Val	Leu	His	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Asp	Ser	Lys	Thr	Asn	Gly	Ala	Gly
196	Glu	Lys	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Val	Ile	Gly	Ala	Asp	Gly
211	Ala	Asn	Ser	Arg	Val	Ala	Lys	Ser	Ile	Asn	Ala	Gly	Asp	Tyr	Glu
226	Tyr	Ala	Ile	Ala	Phe	Gln	Glu	Arg	Ile	Lys	Ile	Ser	Asp	Asp	Lys
241	Met	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Leu	Ala	Glu	Met	Tyr	Val	Gly	Asp	Asp
256	Val	Ser	Pro	Asp	Phe	Tyr	Gly	Trp	Val	Phe	Pro	Lys	Cys	Asp	His
271	Val	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	His	Lys	Ala	Asp	Ile	Lys
286	Lys	Phe	Gln	Leu	Ala	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Ile	Thr
301	Gly	Gly	Lys	Ile	Ile	Arg	Val	Glu	Ala	His	Pro	Ile	Pro	Glu	His
316	Pro	Arg	Pro	Arg	Arg	Leu	Gln	Asp	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Asp
331	Ala	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Lys	Cys	Ser	Gly	Glu	Gly	Ile	Tyr	Phe
346	Ala	Ala	Lys	Ser	Gly	Arg	Met	Cys	Ala	Glu	Ala	Ile	Val	Glu	Gly
361	Ser	Glu	Met	Gly	Lys	Arg	Met	Val	Asp	Glu	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys
376	Tyr	Leu	Glu	Lys	Trp	Asp	Lys	Thr	Tyr	Trp	Pro	Thr	Tyr	Lys	Val
391	Leu	Asp	Ile	Leu	Gln	Lys	Val	Phe	Tyr	Arg	Ser	Asn	Pro	Ala	Arg
406	Glu	Ala	Phe	Val	Glu	Met	Cys	Ala	Asp	Glu	Tyr	Val	Gln	Lys	Met
421	Thr	Phe	Asp	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Lys	Lys	Val	Ala	Pro	Gly	Asn	Pro
436	Ile	Glu	Asp	Leu	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Thr	Ile	Gly	Ser	Leu	Val
451	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Arg	Arg	Glu	Met	Asp	Lys	Leu	Ser	Val	

Abb. 3



BACTERIAL RESISTANCE: KANAMYCINE  
PLANT SELECTION: KANAMYCINE

Abb. 4

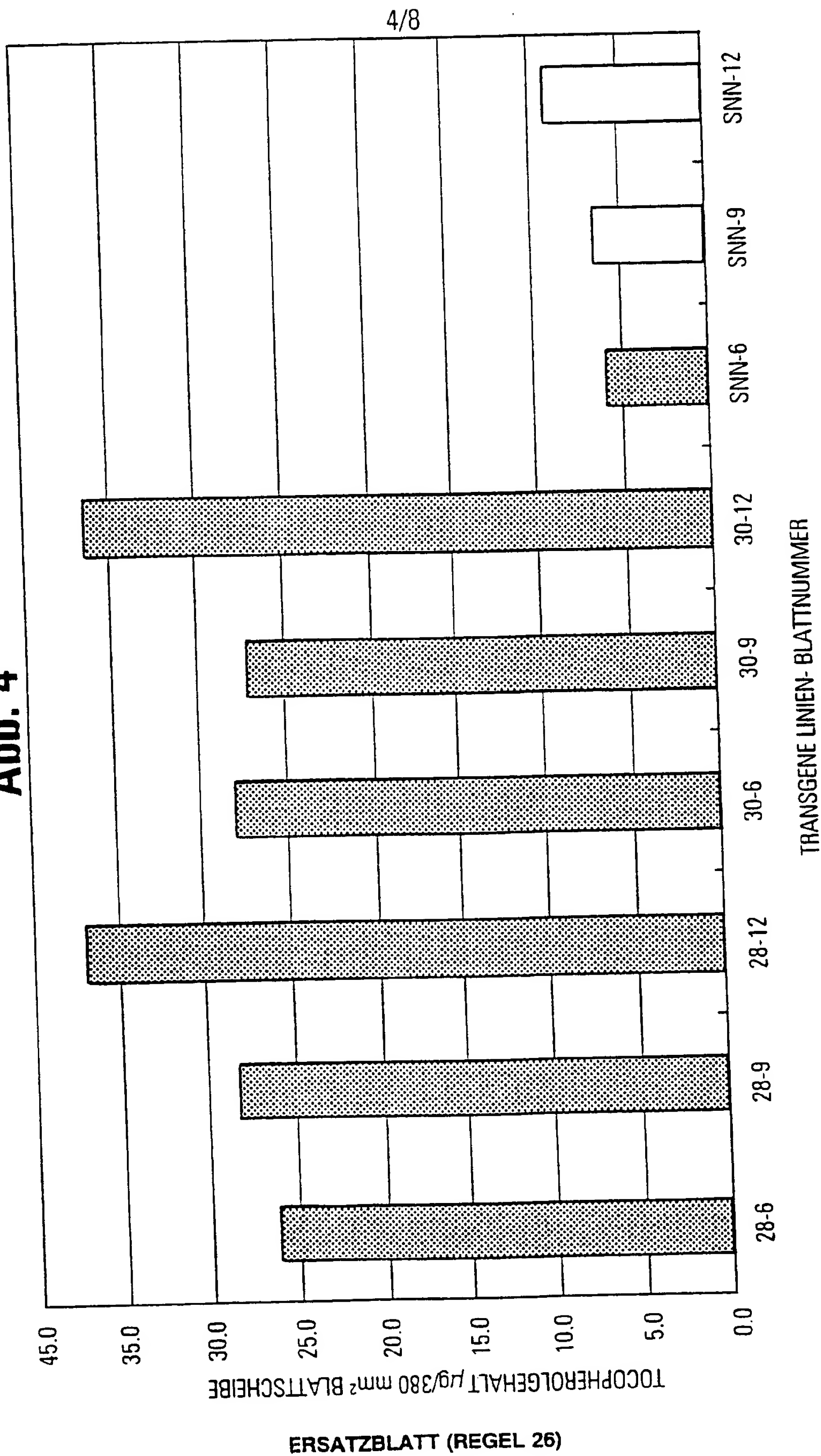


Abb.5

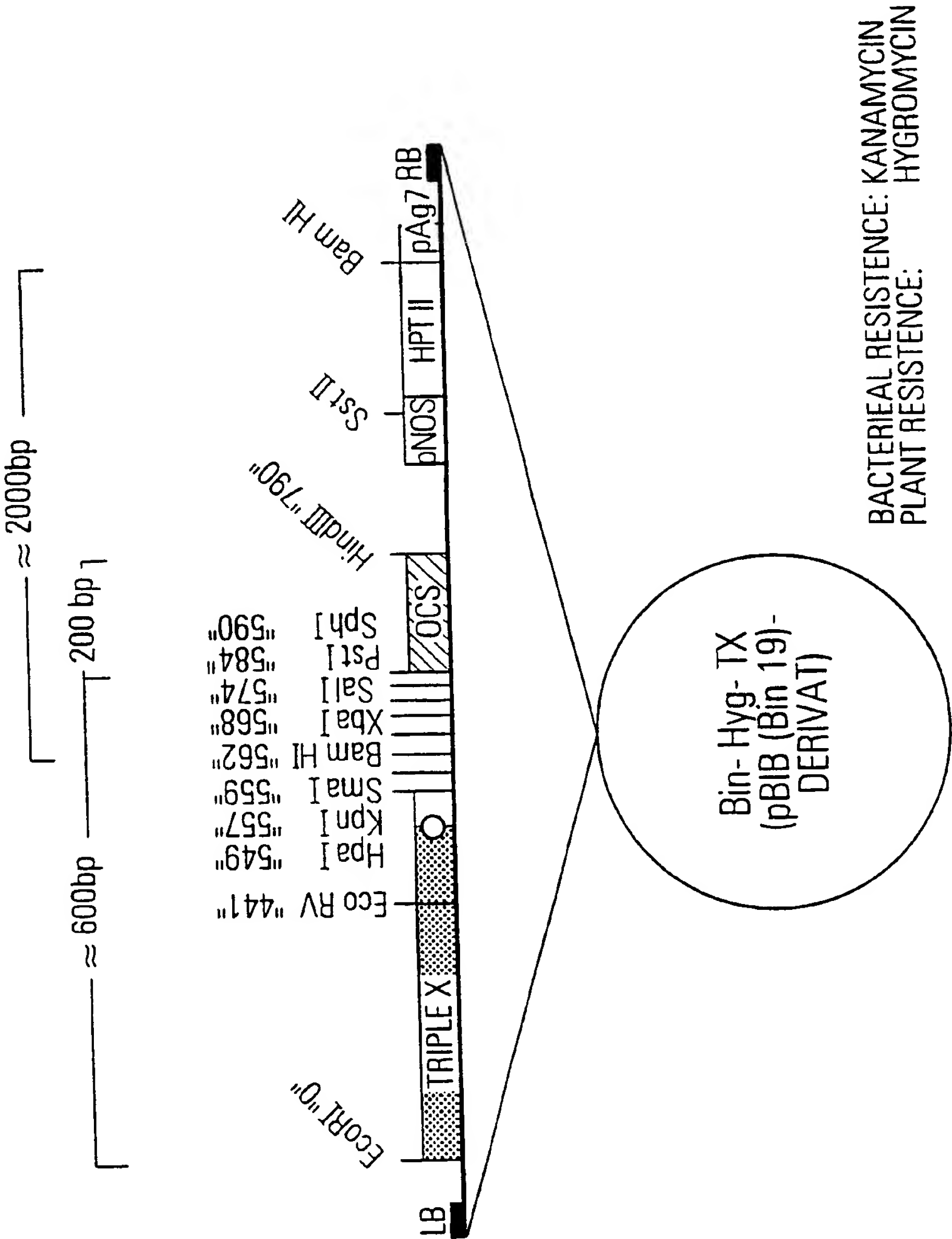
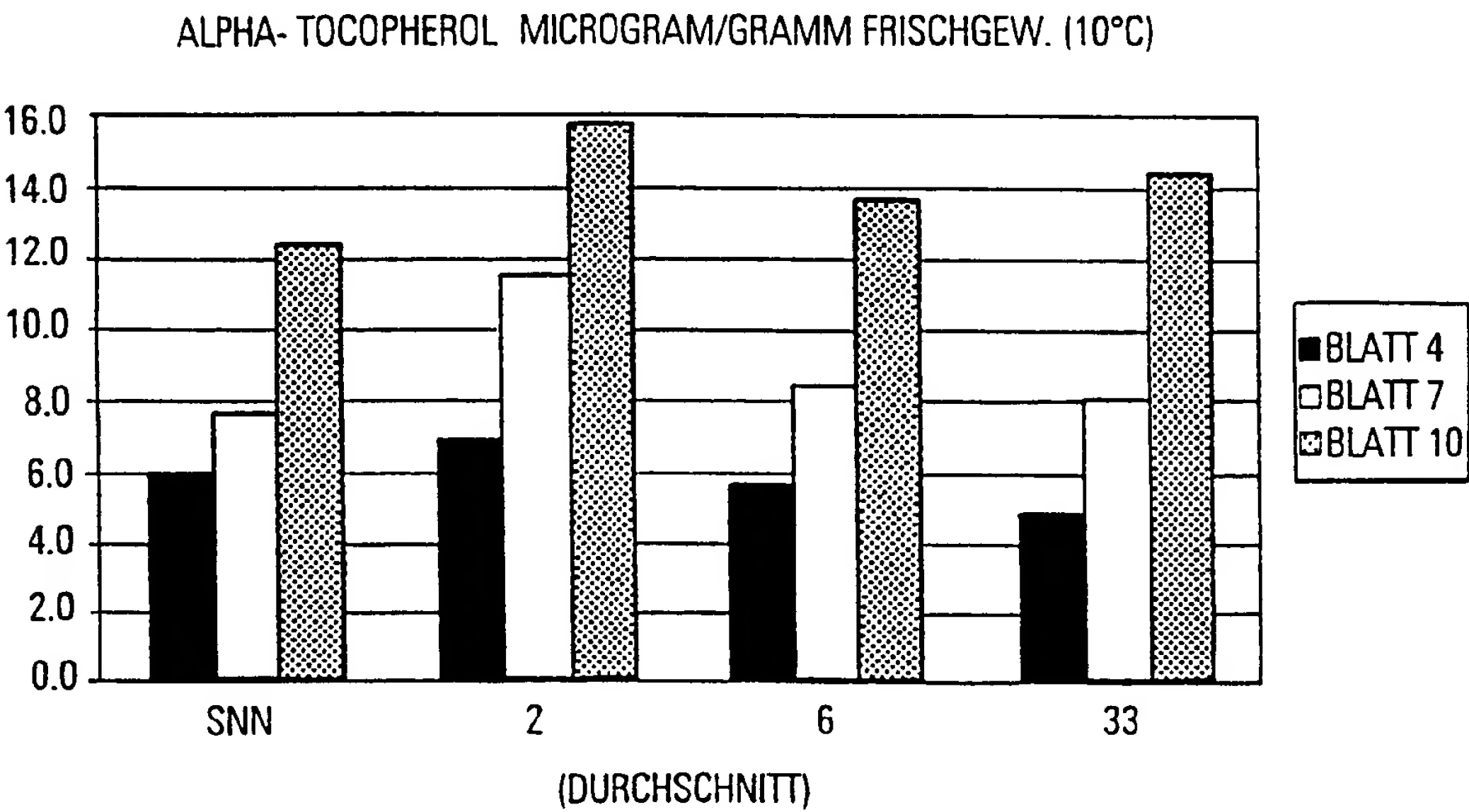
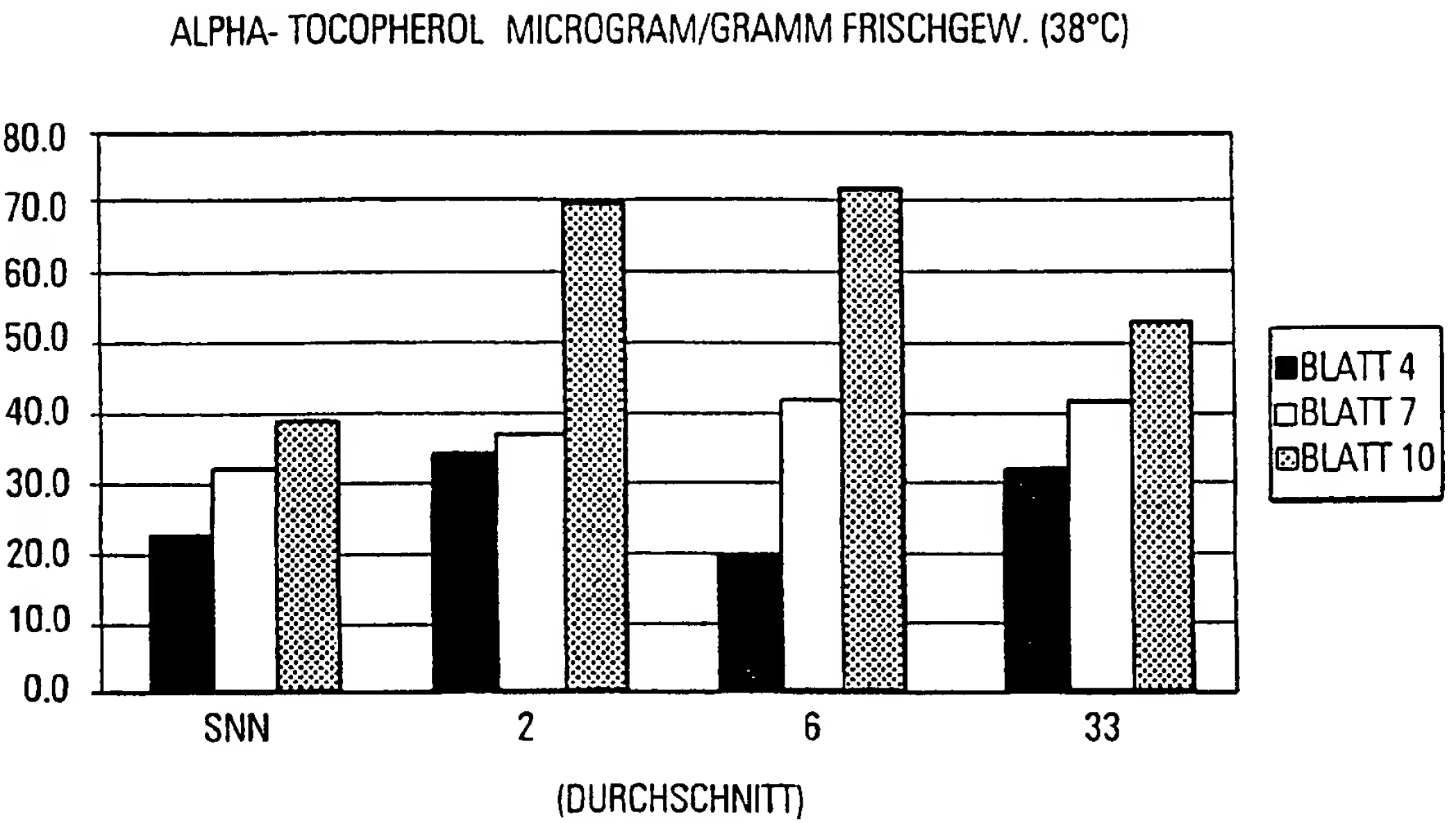
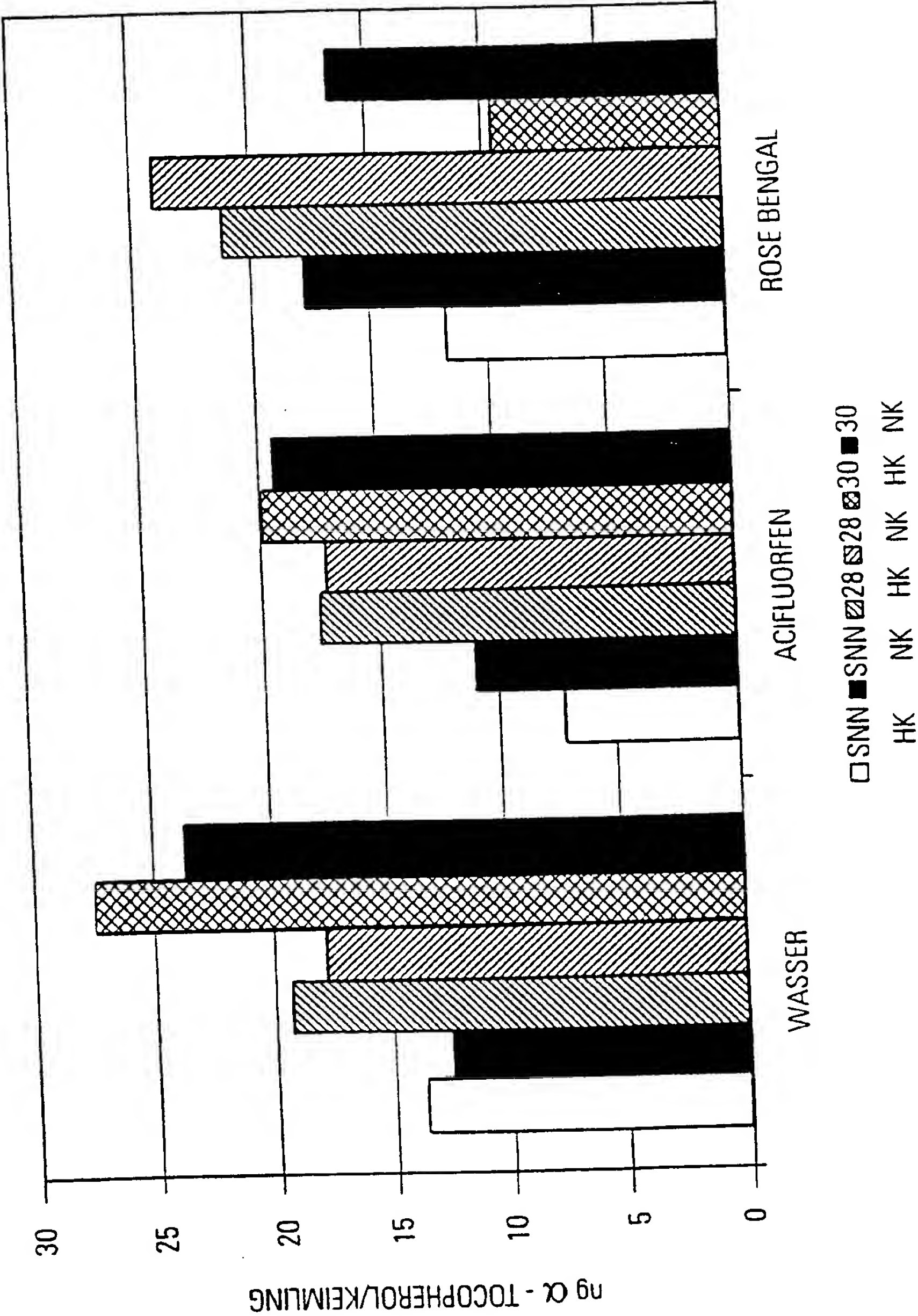


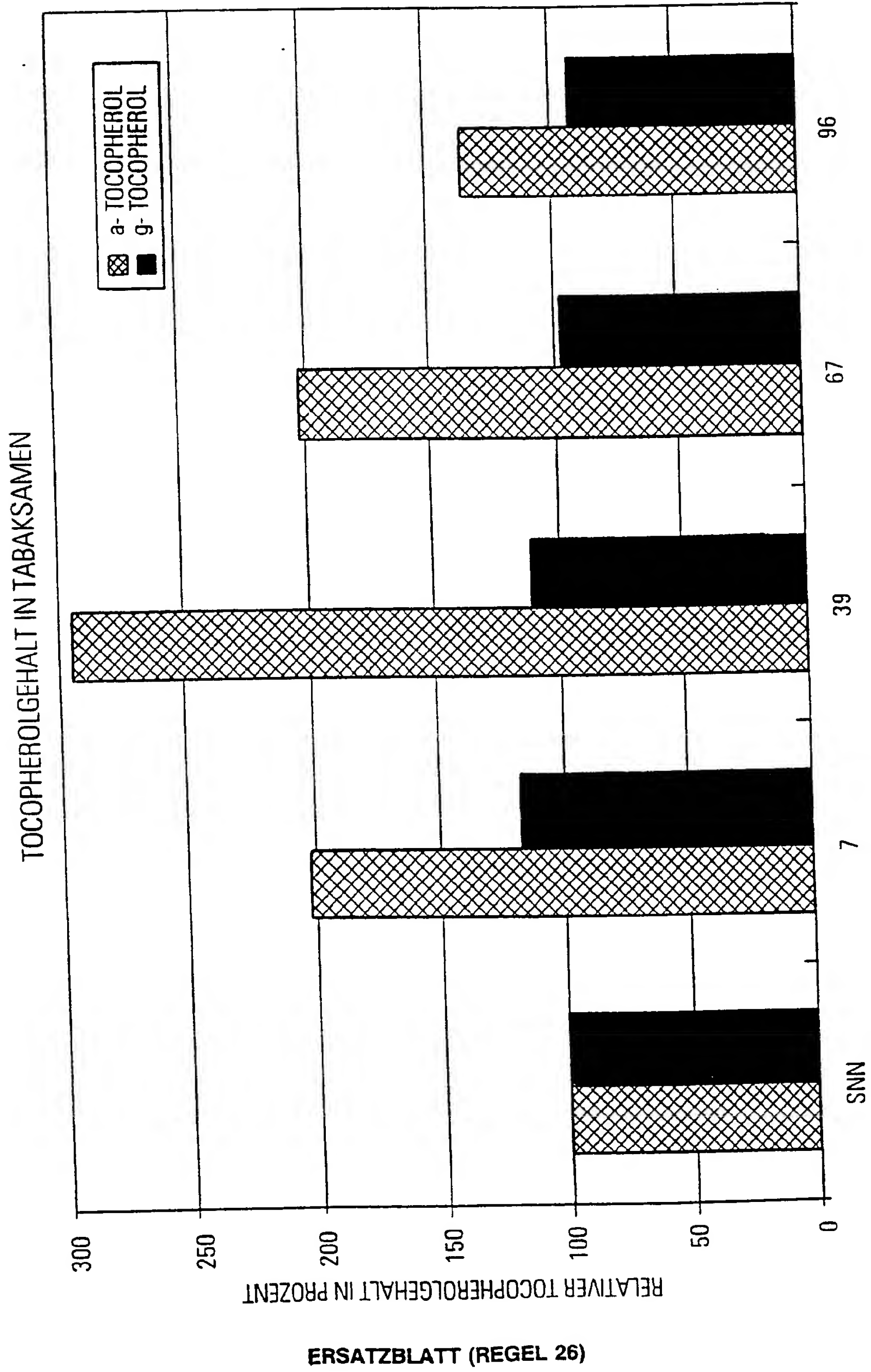
Abb.6



**Abb.7**  
 $\alpha$  - TOCOPHEROLGEHALTE NACH HERBIZIDBEHANDLUNG



**Abb.8**





1 / 6  
SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Institut fuer Pflanzengenetik und  
Kulturpflanzenforschung
- (B) STRASSE: Corrensstrasse 3
- (C) ORT: Gatersleben
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 06466

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Beeinflussung des Tocopherolgehaltes in  
transgenen Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 1510 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATGGCTTCCA TTGCTCTCAA AACTTTCACC GGCCTCCGTC AATCCTCGCC GGAAAACAAT	60
TCCATTACTC TTTCTAAATC CCTCCCCTTC ACCCAAACCC ACCGTAGGCT CCGAATCAAT	120
GCTTCCAAAT CCAGCCCAAG AGTCAACGGC CGCAATCTTC GTGTTGCGGT GGTGGGCGGT	180
GGTCCTGCTG GTGGCGCCGC CGCTGAAACA CTCGCCAAGG GAGGAATTGA AACCTTCTTA	240
ATCGAACGCA AAATGGACAA CTGCAAACCC TCGGGTGGGG CCATCCCCTT TTGCATGGTG	300
GGAGAATTG ACCTCCCTTT GGATATCATT GACCGGAAAG TTACAAAGAT GAAGATGATT	360
TCCCCATCCA ACGTTGCTGT TGATATTGGT CAGACTTTAA AGCCTCACGA GTACATCGGT	420
ATGGTGCGCC GCGAAGTACT CGATGCTTAC CTCCGTGACC GCGCTGCTGA AGCCGGAGCC	480

TCTGTTCTCA ACGGCTTGTT CCTCAAAATG GACATGCCCA AAGCTCCCAA CGCACCTTAC 540  
GTCCTTCACT ACACAGCTTA CGACTCCAAA ACTAATGGCG CGGGGGAGAA GCGTACCCTG 600  
GAAGTTGACG CCGTTATCGG CGCTGACGGT GCAAATTCCC GTGTCGCAA ATCCATAAAC 660  
GCCGGTGACT ACGAGTACGC TATTGCATT CCAAGAAAGGA TTAAAATTTC CGATGATAAA 720  
ATGAAGTATT ACGAGAATTT AGCTGAAATG TACGTGGGTG ATGACGTGTC CCCTGATTTT 780  
TACGGGTGGG TTTTCCCCAA ATGTGACCAC GTTGCCGTTG GCACTGGCAC AGTCACCCAC 840  
AAAGCTGACA TCAAAAATT CCAGCTAGCT ACAAGATTGA GAGCTGATTC CAAAATCACC 900  
GGCGGAAAAA TTATCCGGGT CGAGGCCAC CCGATTCCAG AACACCCAAG ACCCAGAAGA 960  
TTACAAGACA GAGTTGCATT GGTGGTGAT GCGGCAGGGT ACGTGACCAA ATGTTGCGGC 1020  
GAAGGGATTT ACTTCGCGGC AAAGAGTGA CGTATGTGTG CTGAAGCAAT TGTTGAAGGG 1080  
TCAGAAATGG GAAAAGAAT GGTGGACGAG AGTGATTGGA GGAAGTATTT GGAGAAATGG 1140  
GACAAGACTT ATTGGCCAAC GTACAAGGTG CTTGATATAT TGCAGAAGGT ATTTTACAGG 1200  
TCGAATCCGG CGAGGGAAGC ATTTGTTGAA ATGTGCGCAG ATGAGTATGT GCAGAAGATG 1260  
ACATTTGACA GCTATTTGTA CAAGAAAGTA GCACCAGGAA ACCCAATTGA AGACTTGAAG 1320  
CTTGCTGTGA ATACCATTGG AAGTTTGGTG AGAGCTAATG CACTAAGAAG GGAAATGGAC 1380  
AAGCTCAGTG TATAAGAAGA TTAACAGCAT TAATATTTTC TTGTAATTGA AGGATTTATT 1440  
TCTCAAATTA CTCTGTAAAC ACCTTTCATC CTGCCTTTAA TCGGATTTAT GTAAC TTCAT 1500  
AATTTGAGCT 1510

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1510 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 1..1392

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATG GCT TCC ATT GCT CTC AAA ACT TTC ACC GGC CTC CGT CAA TCC TCG 48  
Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser  
1 5 10 15  
CCG GAA AAC AAT TCC ATT ACT CTT TCT AAA TCC CTC CCC TTC ACC CAA 96

Pro	Glu	Asn	Asn	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Lys	Ser	Leu	Pro	Phe	Thr	Gln		
			20					25					30				
ACC	CAC	CGT	AGG	CTC	CGA	ATC	AAT	GCT	TCC	AAA	TCC	AGC	CCA	AGA	GTC	144	
Thr	His	Arg	Arg	Leu	Arg	Ile	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ser	Pro	Arg	Val		
		35					40				45						
AAC	GGC	CGC	AAT	CTT	CGT	GTT	GCG	GTG	GTG	GGC	GGT	GGT	CCT	GCT	GGT	192	
Asn	Gly	Arg	Asn	Leu	Arg	Val	Ala	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Gly		
		50				55				60							
GGC	GCC	GCC	GCT	GAA	ACA	CTC	GCC	AAG	GGA	GGA	ATT	GAA	ACC	TTC	TTA	240	
Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Ala	Lys	Gly	Gly	Ile	Glu	Thr	Phe	Leu		
		65				70				75					80		
ATC	GAA	CGC	AAA	ATG	GAC	AAC	TGC	AAA	CCC	TGC	GGT	GGG	GCC	ATC	CCA	288	
Ile	Glu	Arg	Lys	Met	Asp	Asn	Cys	Lys	Pro	Cys	Gly	Gly	Ala	Ile	Pro		
			85					90						95			
CTT	TGC	ATG	GTG	GGA	GAA	TTT	GAC	CTC	CCT	TTG	GAT	ATC	ATT	GAC	CGG	336	
Leu	Cys	Met	Val	Gly	Glu	Phe	Asp	Leu	Pro	Leu	Asp	Ile	Ile	Asp	Arg		
			100					105						110			
AAA	GTT	ACA	AAG	ATG	AAG	ATG	ATT	TCC	CCA	TCC	AAC	GTT	GCT	GTT	GAT	384	
Lys	Val	Thr	Lys	Met	Lys	Met	Ile	Ser	Pro	Ser	Asn	Val	Ala	Val	Asp		
			115				120					125					
ATT	GGT	CAG	ACT	TTA	AAG	CCT	CAC	GAG	TAC	ATC	GGT	ATG	GTG	CGC	CGC	432	
Ile	Gly	Gln	Thr	Leu	Lys	Pro	His	Glu	Tyr	Ile	Gly	Met	Val	Arg	Arg		
		130				135					140						
GAA	GTA	CTC	GAT	GCT	TAC	CTC	CGT	GAC	CGC	GCT	GCT	GAA	GCC	GGA	GCC	480	
Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Tyr	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly	Ala		
		145				150				155				160			
TCT	GTT	CTC	AAC	GGC	TTG	TTC	CTC	AAA	ATG	GAC	ATG	CCC	AAA	GCT	CCC	528	
Ser	Val	Leu	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Asp	Met	Pro	Lys	Ala	Pro		
			165					170						175			
AAC	GCA	CCT	TAC	GTC	CTT	CAC	TAC	ACA	GCT	TAC	GAC	TCC	AAA	ACT	AAT	576	
Asn	Ala	Pro	Tyr	Val	Leu	His	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Asp	Ser	Lys	Thr	Asn		
			180					185					190				
GGC	GCG	GGG	GAG	AAG	CGT	ACC	CTG	GAA	GTT	GAC	GCC	GTT	ATC	GGC	GCT	624	
Gly	Ala	Gly	Glu	Lys	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Asp	Ala	Val	Ile	Gly	Ala		
		195					200					205					
GAC	GGT	GCA	AAT	TCC	CGT	GTC	GCA	AAA	TCC	ATA	AAC	GCC	GGT	GAC	TAC	672	
Asp	Gly	Ala	Asn	Ser	Arg	Val	Ala	Lys	Ser	Ile	Asn	Ala	Gly	Asp	Tyr		
		210					215					220					
GAG	TAC	GCT	ATT	GCA	TTC	CAA	GAA	AGG	ATT	AAA	ATT	TCC	GAT	GAT	AAA	720	
Glu	Tyr	Ala	Ile	Ala	Phe	Gln	Glu	Arg	Ile	Lys	Ile	Ser	Asp	Asp	Lys		
		225				230				235					240		
ATG	AAG	TAT	TAC	GAG	AAT	TTA	GCT	GAA	ATG	TAC	GTG	GGT	GAT	GAC	GTG	768	
Met	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Leu	Ala	Glu	Met	Tyr	Val	Gly	Asp	Asp	Val		
			245					250						255			

TCC CCT GAT TTT TAC GGG TGG GTT TTC CCC AAA TGT GAC CAC GTT GCC Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp His Val Ala 260 265 270	816
GTT GGC ACT GGC ACA GTC ACC CAC AAA GCT GAC ATC AAA AAA TTC CAG Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Ala Asp Ile Lys Lys Phe Gln 275 280 285	864
CTA GCT ACA AGA TTG AGA GCT GAT TCC AAA ATC ACC GGC GGA AAA ATT Leu Ala Thr Arg Leu Arg Ala Asp Ser Lys Ile Thr Gly Gly Lys Ile 290 295 300	912
ATC CGG GTC GAG GCC CAC CCG ATT CCA GAA CAC CCA AGA CCC AGA AGA Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg Pro Arg Arg 305 310 315 320	960
TTA CAA GAC AGA GTT GCA TTG GTT GGT GAT GCG GCA GGG TAC GTG ACC Leu Gln Asp Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly Tyr Val Thr 325 330 335	1008
AAA TGT TCG GGC GAA GGG ATT TAC TTC GCG GCA AAG AGT GGA CGT ATG Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met 340 345 350	1056
TGT GCT GAA GCA ATT GTT GAA GGG TCA GAA ATG GGA AAA AGA ATG GTG Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val 355 360 365	1104
GAC GAG AGT GAT TTG AGG AAG TAT TTG GAG AAA TGG GAC AAG ACT TAT Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr 370 375 380	1152
TGG CCA ACG TAC AAG GTG CTT GAT ATA TTG CAG AAG GTA TTT TAC AGG Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg 385 390 395 400	1200
TCG AAT CCG GCG AGG GAA GCA TTT GTT GAA ATG TGC GCA GAT GAG TAT Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr 405 410 415	1248
GTG CAG AAG ATG ACA TTT GAC AGC TAT TTG TAC AAG AAA GTA GCA CCA Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro 420 425 430	1296
GGA AAC CCA ATT GAA GAC TTG AAG CTT GCT GTG AAT ACC ATT GGA AGT Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser 435 440 445	1344
TTG GTG AGA GCT AAT GCA CTA AGA AGG GAA ATG GAC AAG CTC AGT GTA Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val 450 455 460	1392
TAAGAAGATT AACAGCATTATATTTTCTT GTAATTGAAG GATTTATTTT TCAAATTACT	1452
CTGTAAACAC CTTTCATCCT GCCTTTAATC GGATTTATGT AACTTCATAA TTTGAGCT	1510

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 464 Aminosaeuren
- (B) ART: Aminosaeure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```

Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser
 1              5              10              15

Pro Glu Asn Asn Ser Ile Thr Leu Ser Lys Ser Leu Pro Phe Thr Gln
          20              25              30

Thr His Arg Arg Leu Arg Ile Asn Ala Ser Lys Ser Ser Pro Arg Val
          35              40              45

Asn Gly Arg Asn Leu Arg Val Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly
          50              55              60

Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Lys Gly Gly Ile Glu Thr Phe Leu
65              70              75              80

Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly Ala Ile Pro
          85              90              95

Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Ile Ile Asp Arg
          100             105             110

Lys Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Val Ala Val Asp
          115             120             125

Ile Gly Gln Thr Leu Lys Pro His Glu Tyr Ile Gly Met Val Arg Arg
          130             135             140

Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Asp Arg Ala Ala Glu Ala Gly Ala
          145             150             155             160

Ser Val Leu Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp Met Pro Lys Ala Pro
          165             170             175

Asn Ala Pro Tyr Val Leu His Tyr Thr Ala Tyr Asp Ser Lys Thr Asn
          180             185             190

Gly Ala Gly Glu Lys Arg Thr Leu Glu Val Asp Ala Val Ile Gly Ala
          195             200             205

Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asn Ala Gly Asp Tyr
          210             215             220

Glu Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Lys Ile Ser Asp Asp Lys
          225             230             235             240

Met Lys Tyr Tyr Glu Asn Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly Asp Asp Val
          245             250             255

Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp His Val Ala

```

260	265	270
Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Ala Asp Ile Lys Lys Phe Gln 275	280	285
Leu Ala Thr Arg Leu Arg Ala Asp Ser Lys Ile Thr Gly Gly Lys Ile 290	295	300
Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg Pro Arg Arg 305	310	315
Leu Gln Asp Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly Tyr Val Thr 325	330	335
Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met 340	345	350
Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val 355	360	365
Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr 370	375	380
Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg 385	390	395
Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr 405	410	415
Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro 420	425	430
Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser 435	440	445
Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val 450	455	460